

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS

Susana Raquel Rodrigues Calçada

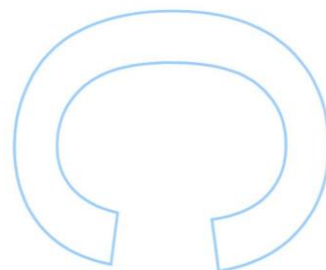
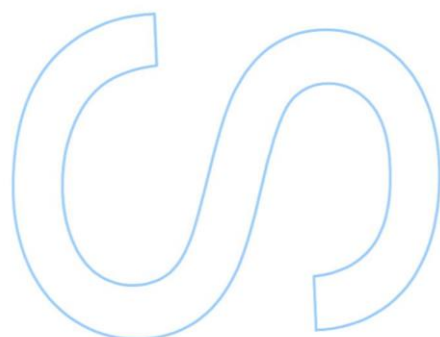
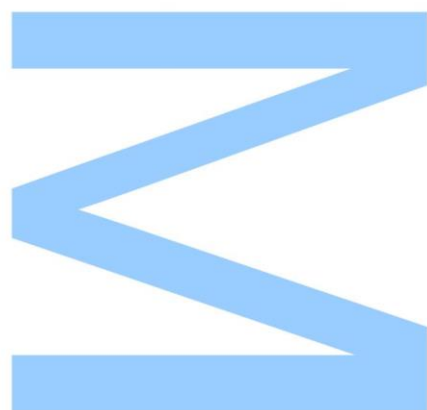
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar
Departamento Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências,
Universidade do Porto
2017

Orientador (Faculdade)

Nuno Mateus
Professor Auxiliar
Faculdade de Ciências, Universidade do Porto

Orientador (Empresa)

Alice Santos
Responsável do Departamento de Química
Silliker Portugal S.A.



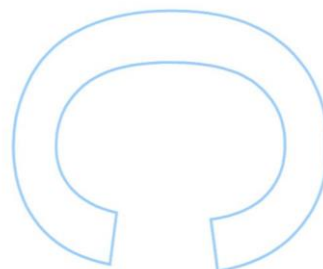
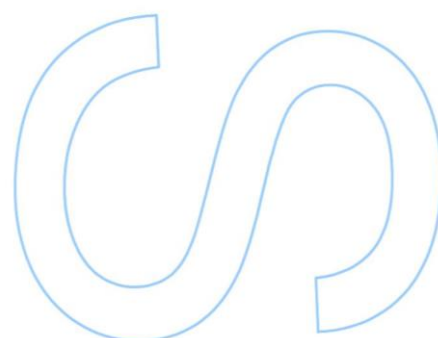
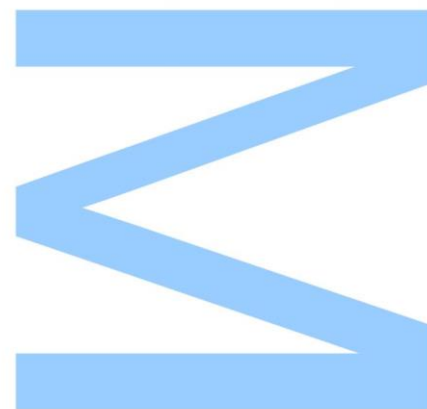


Universidade do Minho



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Empresa Silliker Portugal S.A a oportunidade sem a qual este trabalho não teria sido possível realizar.

Os meus agradecimentos a todos os colaboradores da Silliker por me terem proporcionado esta experiência tão enriquecedora, quer a nível profissional como a nível pessoal, pela simpatia, pelo carinho e pelos bons momentos passados.

Às minhas colegas estagiárias por todo o apoio prestado nos momentos difíceis, pelas palavras de força, por terem ouvido todos os meus receios e estarem sempre disponíveis para ajudar.

Ao meu namorado por todo o carinho, incentivo e companheirismo durante todo este percurso. Obrigada por me fazeres acreditar que os sonhos se podem tornar reais.

À minha família, em especial aos meus pais e irmãos, por estarem sempre ao meu lado em todas as etapas da minha vida. Por não me deixarem desistir e por acreditarem sempre em mim e me incentivarem a continuar a fazer mais e melhor. Muito obrigada pelo apoio, compreensão e amor incondicional.

Resumo

O Setor Agro-alimentar representa uma grande parte da economia nacional e europeia que tem vindo a sofrer alterações nos últimos anos, adaptando os produtos ao gosto do consumidor, tornando-os mais saborosos e com prazos de validade mais alargados de modo a serem mais competitivos. Para perceber se os produtos estão de acordo com os padrões exigidos pelo mercado, o controlo de qualidade no setor alimentar está cada vez mais rigoroso e sofisticado.

O controlo alimentar é realizado através de métodos de análises químicas ou instrumentais e, visto que envolvem técnicas suscetíveis de acumular erros, é necessário que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrarem, através da Validação, que os métodos executados conduzem a resultados credíveis e adequados ao rigor pretendido.

O presente trabalho foi realizado na empresa Silliker Portugal S.A. e teve como principal objetivo a validação de métodos químicos. O método da Determinação de Acidez PAFQ.197 foi concluído e o método da Determinação de Fibra Alimentar PAFQ.230 não foi terminado, mesmo assim os resultados já obtidos são suficientes para descrever neste trabalho. No final, procedeu-se ao tratamento estatístico dos dados obtidos para cada um dos métodos.

Palavras-chave: Controlo da qualidade, Validação de métodos químicos, Química Analítica, Acidez, Fibra alimentar.

Abstract

The Agro-food Sector represents a large part of the national and European economy that has been submitted to significant changes over the recent years, adapting the products to the taste of the consumer, making them full of flavor and with longer shelf-life so being more competitive. To see if the products meet the standards demanded by the market, quality control in the food sector is becoming more rigorous and sophisticated.

Food control is carried out using methods of chemical or instrumental analysis and since they involve techniques that can accumulate errors, it is necessary that laboratories have objective means and criteria to demonstrate, through Validation, that the methods performed lead to credible results and adapted to the desired accuracy.

The present work was carried out in the Silliker Portugal S.A. and its main objective was the validation of chemical methods. The method of Determination of Acidity PAFQ.197 was concluded and the method of Determination of Fiber Food PAFQ.230 was not finished, even though the results already obtained are enough to describe in this work. At the end, the statistical data obtained for each of the methods were processed.

Key words: Quality control, Validation of chemical methods, Analytical chemistry, Acidity, Food fiber.

Índice

Resumo	VII
Abstract	IX
Lista de Figuras	XV
Lista de Tabelas	XVII
Lista de Abreviaturas	XIX
CAPÍTULO I	1
1. O grupo Mérieux NutriSciences	3
2. A empresa	3
3. Enquadramento do trabalho.....	6
3.1. Objetivos propostos	6
3.2. Descrição do trabalho desenvolvido	7
CAPÍTULO II	9
1. Acidez nos Alimentos	11
2. Importância da Fibra Alimentar	11
2.1. Conceito de Fibra Alimentar.....	12
2.2. Classificação	13
2.3. Composição Química	13
3. Validação de métodos Químicos.....	14
3.1. Gama de trabalho	15
3.2. Limiares analíticos	16
3.3. Precisão	17
3.4. Exatidão	19
4. Sistema de controlo Interno	20
4.1. Amostra de controlo diário do Processo	20
4.2. Amostras em duplicado.....	20
4.3. Amostras cegas	21
4.4. Ensaio de Comparação Interlaboratorial.....	21
5. Estudo da Estimativa da Incerteza	23

CAPÍTULO III	25
1. Preparação de Amostras.....	28
2. Validação do método: Determinação da Acidez – PAFQ.197	30
2.1. Objetivo da Validação	30
2.2. Resumo da metodologia	30
2.3. Princípio do método	30
2.4. Plano de validação.....	31
2.5. Cálculos	31
3. Validação do método: Determinação da Fibra Alimentar - PAFQ.230	32
3.1. Objetivo da validação.....	32
3.2. Resumo da metodologia	32
3.3. Princípio do método	32
3.4. Plano de validação.....	33
3.5. Cálculos	35
CAPÍTULO IV	37
1. Resultados da Validação do método: Determinação da Acidez – PAFQ.197	39
1.1. Precisão	39
1.2. Exatidão	46
1.3. Limite de Quantificação.....	46
1.4. Gama de trabalho	46
1.5. Estimativa de Incerteza.....	47
1.6. Resultados	47
2. Resultados da Validação do método: Determinação da Fibra Alimentar – PAFQ.230	50
2.1. Precisão	50
2.2. Exatidão	53
2.3. Limite de Quantificação.....	55
2.4. Gama de trabalho	55
2.5. Incerteza	56

2.6. Resultados	57
3. Conclusão	59
4. Bibliografia.....	61
CAPÍTULO V	63
Anexo 1 - Teste de Grubbs	65
Anexo 2 - Teste de Cochran	65
Anexo 3 – Impresso IQ.22 Estudo da Repetibilidade	66
Anexo 4 – Impresso IQ.29 Estudo da Precisão Intermédia	67
Anexo 5 – Impresso IQ.292 Estudo da Estimativa da Incerteza	68
Anexo 6 – Resultados Determinação de Acidez PAFQ.197	70
Anexo 7 – Resultados Determinação de Fibra Alimentar PAFQ.230	71

Lista de Figuras

Figura 1 - Serviços apresentados pela Mérieux NutriSciences.	3
Figura 2 - Instalações da Siliker Portugal S.A.	5
Figura 3 - Composição Química da Fibra Alimentar.	13
Figura 4 – Aumento do grau de exigência da validação consoante a natureza do Método.	14
Figura 5 - Avaliação do desempenho com Z-score. Adaptado de [11]	23
Figura 6 – Demonstração do processo de validação usado durante o estágio.	28
Figura 7 – Funções associadas aos procedimentos de preparação de amostras desenvolvidos pela Siliker.	29
Figura 8 - Esquema de determinação de acidez, pelo método de titulação.	30
Figura 9 - Esquema de determinação da fibra alimentar, pelo método enzimático.	33

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Domínios alimentares considerados pelo laboratório da Silliker Portugal....	4
Tabela 2 - Métodos para validar durante o estágio.....	7
Tabela 3 – Cálculo da componente da incerteza associada à precisão intermédia do método, para o estudo da estimativa da “incerteza global”. Adaptado de [23,24].....	24
Tabela 4 – Matrizes escolhidas para a Validação do método da Determinação de Acidez PAFQ.197.	31
Tabela 5 – Matrizes escolhidas para a Validação do método da Determinação de Fibra Alimentar PAFQ.230.....	34
Tabela 6 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em NaOH 1N.....	40
Tabela 7 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em Ácido Láctico.....	40
Tabela 8 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em Ácido Acético.....	41
Tabela 9 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em Ácido Fosfórico.....	41
Tabela 10 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em Ácido Cítrico Anidro.....	42
Tabela 11 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em Ácido Cítrico Monoidratado.	42
Tabela 12 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em Ácido Málico.	43
Tabela 13 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em Ácido Tartárico.	43
Tabela 14 - Limite de repetibilidade e limite de repetibilidade relativo, associado a cada uma das gamas de acidez estabelecidas, para o método interno PAFQ.197 Determinação de Acidez.....	44
Tabela 15 - Desvio padrão e limite de precisão intermédia obtidos no estudo da precisão intermédia para o método da Determinação de Acidez PAFQ.197.	45
Tabela 16 - Resultado obtido para a Exatidão, expresso em NaOH 1N, para o método Determinação de Acidez PAFQ.197.....	46
Tabela 17 – Gama de trabalho para o método da Determinação de Acidez.	46
Tabela 18 – Incerteza Relativa estimada para a validação do método da Determinação de Acidez PAFQ.197.	47

Tabela 19 – Apresentação dos resultados finais para a Validação da Determinação de Acidez PAFQ.197	48
Tabela 20 - Média, variância e limite de repetibilidade para os resultados da Fibra Alimentar com teor <1.	50
Tabela 21 - Média, variância e limite de repetibilidade para os resultados da Fibra Alimentar com teor 1-10.	51
Tabela 22 – Média, variância e limite de repetibilidade para os resultados da Fibra Alimentar com teor >10.	52
Tabela 23 – Limite de repetibilidade da e limite de repetibilidade relativo, associado a cada uma das gamas dos teores de fibra alimentar estabelecidas, para o método interno PAFQ.230 Determinação de Fibra Alimentar.	52
Tabela 24 - Desvio padrão e limite de precisão intermédia obtidos no estudo da precisão intermédia da Determinação de Fibra Alimentar.....	53
Tabela 25 - Resultados obtidos dos ensaios de comparação interlaboratorial para teores de Fibra <10 g/100g.	53
Tabela 26 - Resultados obtidos dos ensaios de comparação interlaboratorial para teores de Fibra ≥ 10 g/100g.....	55
Tabela 27 – Gama de trabalho estabelecida a partir da validação efetuada para o método da Determinação da Fibra Alimentar PAFQ.230.	55
Tabela 28 - Dados utilizados para determinar a componente da incerteza associada à precisão do método Determinação da Fibra Alimentar PAFQ.230.....	56
Tabela 30 - Apresentação dos resultados finais para a Validação da Determinação de Fibra Alimentar PAFQ.230.....	57
Tabela 31 – Resultados da Validação Determinação da Acidez PAFQ.197.....	70
Tabela 32 – Resultados da Validação Determinação de Fibra Alimentar PAFQ.230. .	71

Lista de Abreviaturas

A.O.A.C.	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
CC	Carta de Controlo
CQ	Controlo da Qualidade
DPCS	<i>Daily Process Control Sample</i>
ECI	Ensaio de Comparação Interlaboratorial
EN	Norma Europeia
ER	Ensaio de recuperação
FQ	Físico-Química
GUM	<i>Guide to the expression of uncertainty in measurement</i>
IAF	<i>International Accreditation Forum</i>
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i>
IPAC	Instituto Português de Acreditação
IPQ	Instituto Português da Qualidade
IQ	Impresso da Qualidade
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de deteção
LI	Limite inferior
LQ	Limite de Quantificação
LS	Limite superior
MIA	Métodos Instrumentais de Análise
MQ	Manual da Qualidade
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
NP	Norma Portuguesa
PAFQ	Procedimento de Análises Físico-Químicas
PCE	Procedimentos de Calibração de Equipamentos
PCQ	Procedimento de Controlo da Qualidade
PEQ	Procedimento de utilização de Equipamentos
PGQ	Procedimento de Gestão da Qualidade
PME	Procedimento de Manutenção de Equipamentos
SG	Sistema de Gestão
SPQ	Sistema Português da Qualidade
TP	Teste de Proficiência

CAPÍTULO I

Enquadramento do Trabalho

1. O grupo Mérieux NutriSciences

A multinacional Mérieux NutriSciences, com sede em Chicago e presente em 21 países com mais de 80 laboratórios desenvolvidos pelo Institut Mérieux, distingue-se por ser independente na prestação de serviços no sector agroalimentar (**Figura 1**). Utilizando serviços de controlo analítico, consultoria, auditoria, formação, investigação e serviços de análise sensorial, promove a saúde pública. A partir de ensaios microbiológicos e físico-químicos determina detalhadamente a composição de cada género alimentício. Além da sua preocupação com a saúde pública, a Mérieux NutriSciences, contribui para a inovação de produtos alimentares e resolução de problemas industriais, garantindo a sua segurança e qualidade. ^[1]

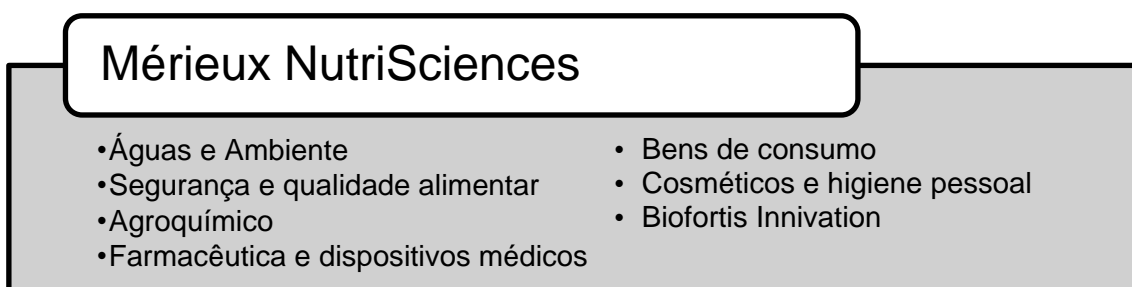


Figura 1 - Serviços apresentados pela Mérieux NutriSciences.

2. A empresa

O estágio foi realizado na empresa Silliker Portugal S.A (**Figura 2**), fundada em 1992 no concelho de Vila Nova de Gaia e pertence ao grupo internacional Mérieux NutriSciences.

Esta empresa oferece serviços que incluem análises microbiológicas, químicas e sensoriais, consultadoria em segurança alimentar, auditorias, rotulagem e legislação. De modo a garantir a competência dos serviços ao cliente, a empresa criou e utiliza procedimentos e políticas de trabalho que asseguram a sua qualidade. Em 1993 integrou o Instituto Português da Qualidade (IPQ) com a acreditação do laboratório pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), através do certificado número L0087, de acordo com o referencial normativo NP EN ISO/IEC 17025 - *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*. ^[2]

Para além de cumprir os requisitos necessários à acreditação dos laboratórios, a empresa tem de cumprir os critérios impostos pelo Sistema global e único de gestão

da qualidade do grupo Silliker. O Sistema de Gestão da Qualidade da Silliker envolve requisitos como:

- participar em ensaios de comparação interlaboratorial (ECI);
- participar em auditorias internas anuais organizadas pelo grupo Silliker;
- possuir um consistente programa de formação dos colaboradores;
- monitorizar a evolução da satisfação dos clientes.

O grupo possui também um programa de análise de amostras diárias para controlo do processo, DPCS, do inglês, *Daily Process Control Sample*.^[2]

Na **Tabela 1** estão apresentados os domínios alimentares considerados pelo laboratório da Silliker Portugal, associados a um número (ID) que será utilizado para identificar o respetivo domínio ao longo do trabalho.

Tabela 1 – Domínios alimentares considerados pelo laboratório da Silliker Portugal.

ID	Grupo	Exemplo de Matrizes
1	Açúcar, produtos açucarados e derivados	Açúcar, adoçantes, doces, geleias, mel chocolate, rebuçados, etc.
2	Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Pratos cozinhados, sanduiche, pizza, molhos (ketchup), sopas, batatas fritas.
3	Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Suplementos alimentares, farinha láctea, farinha não láctea, levedura de cerveja, leveduras.
4	Alimentos para animais	Alimentação animal
5	Bebidas alcoólicas	Cerveja, vinho, sidra, sangria, panaché.
6	Bebidas não alcoólicas	Água, batido, néctar, refrigerante.
7	Café, chá, infusões e derivados	Café (moído, grão), cevada, chá e infusões.
8	Carnes, produtos cárneos e derivados	Alheira, fiambre, salpicão, chouriços, pernil.
9	Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Arroz, farinhas, feijão, cones de milho, padaria, massa alimentícia.
10	Especiarias, condimentos e derivados	Pimenta, sal, orégãos, mostarda, vinagre, coentros.
11	Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados	Frutos frescos e secos, polpa de fruta, pickles, tremçoço, concentrado de tomate.
12	Gorduras, óleos, sementes oleaginosas e derivados	Azeite, creme de soja, maionese.
13	Leite, produtos lácteos e	Galão, queijo, manteiga, natas, leite com

	derivados	chocolate.
14	Ovos e derivados	Clara, gema e ovo líquido.
15	Produtos da pesca e derivados	Peixes, crustáceos, moluscos e conservas.

A Silliker engloba três grandes laboratórios que se responsabilizam por diferentes setores de análise:

- Laboratório de Físico-Química (FQ) – técnicas de análise clássica.
- Laboratório de Métodos Instrumentais de Análise (MIA) – técnicas cromatográficas e espectrofotométricas.
- Laboratório de Microbiologia – análises microbiológicas.

“A saúde e o bem-estar dos consumidores estão no centro das nossas preocupações. Por essa razão, esforçamo-nos por oferecer os melhores serviços aos nossos clientes.” Seguindo este lema, a elevada variedade de análises executadas nestes laboratórios permite dar ao cliente um serviço completo e detalhado sobre qualquer matriz alimentar e, por essa razão, a empresa mantém-se no topo a nível nacional. [3]



Figura 2 - Instalações da Silliker Portugal S.A.

3. Enquadramento do trabalho

A alimentação é definida como um conjunto de hábitos que garantem as funções vitais do ser humano, devendo e podendo melhorar a sua saúde. A qualidade alimentar abrange todas as características do produto que fazem com que o consumidor fique satisfeito com o mesmo. Propriedades mecânicas, sensoriais, funcionais e de segurança, valores nutricionais e seus constituintes químicos fazem parte da qualidade. Estes parâmetros podem ser avaliados através de métodos químicos e instrumentais, fornecendo medidas quantitativas de atributos que são utilizadas para a investigação e inovação de produtos alimentares. O consumidor é muitas vezes iludido com a ideia de que as características organoléticas refletem a qualidade do produto em termos nutricionais, o que nem sempre acontece. ^[4]

O crescimento demográfico desencadeou a evolução da indústria alimentar por forma a suprir as necessidades de uma população cada vez mais urbana e longe das fontes naturais de alimentação. Os consumidores optam por alimentos prontos a consumir que aliados ao stress e à falta de exercício físico conduzem a graves problemas na saúde humana.

O conhecimento da qualidade em termos analíticos é fundamental para a melhoria dos hábitos alimentares através da produção de alimentos mais ricos em termos nutricionais. A sociedade está cada vez mais informada sobre as consequências de uma má alimentação e, por isso, é cada vez mais exigente quanto à qualidade e segurança dos alimentos e aos seus benefícios na manutenção da saúde e prevenção de doenças. ^[5]

3.1. Objetivos propostos

A Silliker Portugal, S.A. procura auxiliar a indústria a encontrar soluções para os desafios atuais do sector alimentar. Como já foi referido, a empresa segue a norma ISO/IEC 17025 e, por isso, a validação dos métodos analíticos é crucial para garantir a validade dos resultados obtidos.

O trabalho desenvolvido durante este estágio teve como principal objetivo a validação de métodos químicos executados no laboratório de Físico-Química (FQ) e no laboratório de Métodos Instrumentais de Análise (MIA).

A validação de métodos químicos exige a execução de ensaios necessários para obtenção dos seguintes critérios:

- Precisão (repetibilidade; precisão intermédia);
- Exatidão;
- Limite de quantificação;
- Gama de trabalho;
- Incerteza;

Estes podem ser calculados a partir da análise de amostras realizadas nos laboratórios da Silliker Portugal S.A. e de ensaios de comparação interlaboratorial.

3.2. Descrição do trabalho desenvolvido

O tempo de realização de cada validação depende, não só do próprio tempo de execução do método, mas sobretudo da quantidade de ensaios necessários. Uma das dificuldades neste trabalho foi gerir a utilização dos equipamentos, pois objetivo do laboratório será sempre dar prioritariamente resposta aos pedidos dos clientes.

É importante salientar que o processo de validação não é linear, variando de método para método, das ferramentas de validação disponíveis e dos recursos existentes.

Durante este estágio tive a possibilidade de avançar com a validação de quatro métodos e fazer o acompanhamento diário dos mesmos em amostras para clientes. O trabalho executado por mim foi sempre acompanhado pela analista responsável de cada método. Na **Tabela 2** é possível ver a listagem dos métodos para validação.

Tabela 2 - Métodos para validar durante o estágio.

Método	Designação
Fibra Alimentar	PAFQ.230
Acidez	PAFQ.197
Vitamina A	PAFQ.037
Vitamina E	EN 12822

A falta de oportunidade da utilização de certos equipamentos originou a insuficiência de resultados que pudessem validar os métodos da Determinação das Vitaminas A e E. Por esta razão, neste trabalho não serão apresentados conclusões sobre os mesmos.

No caso da validação do método da Determinação da Acidez o objetivo da empresa foi transformar a norma NP-1421 – “Determinação da acidez em géneros alimentícios derivados de frutos e produtos hortícolas” num Procedimento de Análises Físico-Químicas (PAFQ) de modo a abranger todos os géneros alimentícios.

Quanto à validação do método da Determinação de Fibra Alimentar esta foi realizada para substituir a validação anterior cujo prazo tinha expirado.

CAPÍTULO II

Fundamentos Teóricos

1. Acidez nos Alimentos

A determinação de acidez nos alimentos é fundamental para conhecer e estudar o seu estado de conservação. Um processo de decomposição pode ser originado por oxidação, fermentação ou por hidrólise, apodrecendo um alimento.

Na indústria alimentar são usados cada vez mais acidificantes ou reguladores de acidez que, de acordo com o ponto 6 e 7 do Anexo I do Regulamento (CE) N.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro, são definidos como “substâncias que aumentam a acidez dos géneros alimentícios e/ou lhes conferem um sabor acre” e “substâncias que alteram ou controlam a acidez ou a alcalinidade dos géneros alimentícios”, respetivamente.

Na maioria dos casos, o método utilizado para a determinação de acidez é feito a partir de uma titulação com viragem à fenolftaleína como indicador. Quando as amostras são coloridas ou turvas, deve ser usado o método potenciométrico. Neste último, o potenciómetro deverá ser calibrado com recurso a soluções-tampão de pH conhecido.^[6]

Para este trabalho laboratorial a definição usada para acidez é a seguinte:

- Definição de acidez: Volume de solução alcalina normal, expresso em centímetros cúbicos (miliequivalentes) necessário para neutralizar 100 cm³ do produto, quando este for líquido, ou 100 g, quando for pastoso ou sólido.^[7]

2. Importância da Fibra Alimentar

É de conhecimento geral que os alimentos que consumimos devem ser a base para uma vida saudável. Estes fornecem os elementos nutricionais e calóricos necessários para o bom funcionamento do organismo. De entre estes elementos, a fibra alimentar tem despertado um grande interesse nas últimas décadas, tendo sido realizados vários trabalhos nesse âmbito.

Com a crescente agitação da vida moderna, associada à migração das populações rurais para os centros urbanos, os alimentos naturais foram sendo substituídos pelos processados e refinados. Estes alimentos industrializados são ricos em gorduras saturadas e pobres em fibra alimentar. Estudos mostram que o aumento do consumo deste tipo de alimentos, aliados ao stress e à redução da prática de exercício físico, gerou o aumento de diversos distúrbios na saúde humana, como obesidade, hipertensão e problemas cardíacos.^[5]

Estudos científicos revelam que, hoje em dia, as fibras alimentares têm um papel fundamental na prevenção destas doenças e que dietas ricas em cereais, frutas e vegetais estão relacionadas com o decréscimo de incidência de vários tipos de cancro.

Nos últimos tempos, a criação e inovação de produtos ricos em fibras está “na moda” e, por isso, a análise deste tipo de alimentos aumentou.

2.1. Conceito de Fibra Alimentar

O conceito de fibra alimentar mudou consideravelmente nos últimos anos. Atualmente, este conceito abrange uma gama muito mais ampla de substâncias do que se considerava anteriormente e tem uma importância fisiológica maior do que se pensava. A base de ligação entre essas substâncias é o facto de não serem digeridas pelo organismo humano. Não existe, contudo, uma definição universalmente aceite de fibra alimentar tanto na Europa como no resto do mundo. Existe, no entanto, consenso de que há necessidade de uma definição assente em aspetos fisiológicos.^[8]

Hoje em dia, a grande necessidade da definição exata de fibra alimentar advém da importância da rotulagem nutricional, onde são apresentadas as tabelas de composição dos alimentos, que permitem aos fabricantes fornecerem informação rigorosa ao consumidor. As definições usadas para fibra alimentar estão relacionadas com diversos métodos analíticos adotados para o seu doseamento, nomeadamente pela *Association of Official Analytical Chemists International (AOAC)*.^[8]

Assim, a definição usada para a elaboração deste relatório será a seguinte:

- Definição de Fibra Alimentar: Mistura complexa de substâncias orgânicas, constituída por compostos hidrofílicos tais como polissacáridos solúveis e insolúveis não digestíveis (celuloses e hemi-celuloses) assim como por compostos mais ou menos hidrofóbicos como gomas, ceras, pectinas, cutinas, suberinas e lenhinas. Estas fibras são constituídas por resíduos de células vegetais resistentes à hidrólise das enzimas digestivas do homem.^[9]

O PAFQ.230 “Determinação de Fibra Alimentar”, desenvolvido na Silliker, teve como base os seguintes documentos:

- AOAC 985.29 – Total Dietary Fiber in Foods. Enzymatic-Gravimetric Method
- AOAC 991.43 – Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods. Enzymatic-Gravimetric Method, MÉS-TRIS Buffer.

2.2. Classificação

Segundo a grande maioria dos autores, a fibra alimentar total (TDF - Total Dietary Fiber) é classificada de acordo com a sua solubilidade em água, em duas frações: fibra alimentar solúvel (SDF) e fibra alimentar insolúvel (IDF).^[10]

2.3. Composição Química

Na **Figura 3** está apresentado um esquema que refere os principais componentes químicos da Fibra Alimentar.^[9]

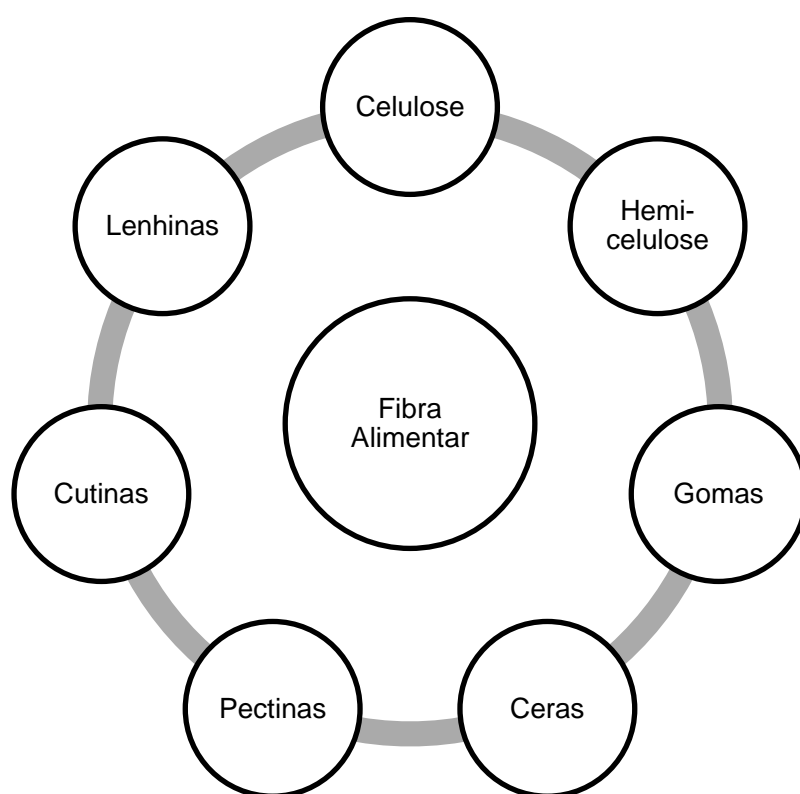


Figura 3 - Composição Química da Fibra Alimentar.

3. Validação de métodos Químicos

Um método experimental envolve processos suscetíveis de acumulação de erros levando a alterações que poderão ser significativas no valor do resultado final. ^[11]

De acordo com a norma ISO/IEC 17025 a validação de um método analítico garante a credibilidade de um novo processo, de um equipamento e, sobretudo, da metodologia analítica. Em vários sectores desta atividade a qualidade do produto fabricado é uma das principais razões da sobrevivência dos mesmos. Desta forma, é essencial que os laboratórios mostrem a partir da validação, que os métodos internos que utilizam diariamente, fornecem resultados suficientemente próximos do valor verdadeiro. É de referir que todos os métodos devem estar descritos num procedimento experimental e todos os equipamentos e instrumentos utilizados devem encontrar-se em perfeito estado de funcionamento e devidamente calibrados.

Os métodos usados em laboratório podem ser normalizados ou não normalizados e, por isso, o processo de validação vai depender da sua natureza. Os métodos que seguem uma norma de ensaio ou documentos normativos, como os Standart Methods, são os métodos normalizados. Prevê-se que estes tenham sido devidamente aprovados pelas entidades responsáveis, estando sujeitos a atualizações periódicas, sendo reconhecidos pela comunidade laboratorial nacional e internacional. ^[11]

Os métodos não normalizados ou internos podem ser ajustados a partir dos métodos normalizados, provenientes de literatura científica, ou desenvolvidos pelo próprio laboratório. Nestes casos, o processo de validação terá de ser mais exigente, recorrendo a mais ferramentas de avaliação, evidenciando que o procedimento cumpre os objetivos previstos e é apropriado ao uso. Assim o grau de exigência aumenta conforme descrito na **Figura 4**. ^[11]

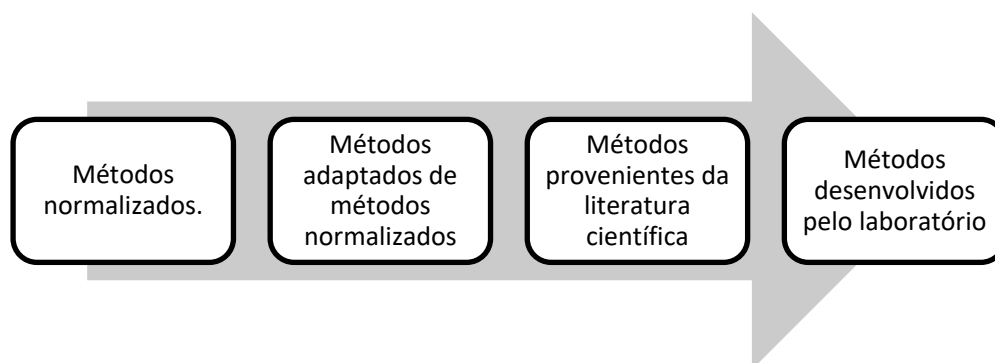


Figura 4 – Aumento do grau de exigência da validação consoante a natureza do Método.

A validação deve ser aplicada num período pré estabelecido, na implementação de um novo método de análise, assim como, sempre que seja necessário a alteração do procedimento técnico interno, por exemplo, para alargar o campo de aplicação. ^[12]

Além do processo de validação, a IPAC tem como requisito para a acreditação de um método interno, a elaboração de documentos que definam os parâmetros de desempenho do método, para que qualquer analista, com preparação adequada, o consigo praticar. ^[13]

Para isso, a Silliker Portugal desenvolveu os Procedimentos de Análises Físico-Químicas (PAFQ) que visam descrever o procedimento do método juntamente com as ações definidas pelo CQ (Controlo de Qualidade) para garantir a qualidade dos resultados, e ainda, o impresso da Qualidade 78 – Validação de Métodos onde estão preservados os documentos que mostram o desempenho dos critérios avaliados para cada método.

Como anteriormente referido, a exigência da validação varia consoante a natureza do método a ser avaliado. Como tal, dado que o trabalho realizado neste estágio abrangeu apenas a validação de métodos normalizados e métodos internos adaptados, estes não necessitam da avaliação de todos os parâmetros de desempenho. Somente serão abordados nesta secção os parâmetros utilizados pela Silliker Portugal: gama de trabalho; limiares analíticos (limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ)); precisão; exatidão. ^[11]

É de referir que no caso da validação da Determinação de Acidez PAFQ-197 foram feitos 8 ensaios para cada matriz e, no caso da Validação da determinação da Fibra Alimentar PAFQ-230, apenas 4 ensaios para cada matriz. O último método já tinha sido validado e, por isso, o número de ensaios podia ser inferior.

3.1. Gama de trabalho

No geral, para todos os métodos quantitativos existe um intervalo de concentrações para o analito para que o método possa ser aplicado. Assim, a gama de trabalho representa a gama de concentrações na qual a sensibilidade é considerada constante e são normalmente expressas nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico.

No caso de métodos onde utilizem técnicas instrumentais, o estudo da gama de trabalho é, na maioria, realizado a partir do método da curva de calibração, podendo também ser usado o método da adição padrão ou o método do padrão interno. Por outro lado, para os métodos da química clássica, como gravimetrias e titulações, a gama de trabalho necessita ser definida previamente, tendo em conta as necessidades do cliente e as condições de trabalho permitidas.

O limite inferior da gama de trabalho é definida pelo limiar de quantificação para métodos clássicos e o limite superior é avaliado por análise de amostras de clientes e padrões. Assim, é possível avaliar até onde o método responde com uma precisão e exatidão adequadas ao uso pretendido. ^[12,13]

3.2. Limiares analíticos

Na validação de um método é importante avaliar, também, os limites analíticos do método. De acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) são definidos como: limite de deteção e limite de quantificação.

3.2.1. Limite de Deteção

O limite de deteção (LD) corresponde ao teor mínimo medido, acima do qual é possível detetar a presença do analito a analisar, com uma certeza estatisticamente admissível. Este limite diz respeito à concentração mais baixa do analito que pode ser detetada numa amostra, mas pode não ser necessariamente quantificada como um valor exato.

Na química clássica não se determina o LD por ser, na maioria dos casos, irrealizável. Por outro lado, também não demonstra ser um parâmetro que tenha interesse para os clientes devido ao género de analito que são analisados. ^[13]

3.2.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) designa a concentração mais baixa do analito em que é possível a sua quantificação, com uma determinada exatidão e precisão.

O LQ em química clássica é calculado a partir de ensaios de recuperação ou com base nos dados obtidos durante os estudos das amostras de cliente e/ou materiais de referência certificados. Desta maneira, é da responsabilidade do laboratório estabelecer um limite que represente uma execução aceitável, ou seja, um

valor mínimo para o qual o método responda com uma precisão e exatidão admissíveis. [13]

3.3. Precisão

Segundo a ISO 3534 entende-se por precisão a “concordância entre os resultados obtidos por aplicação do mesmo procedimento de ensaio várias vezes em materiais idênticos, em condições definidas”. É, geralmente, avaliada através da determinação da repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade, sendo expressas como desvio padrão ou desvio padrão relativo. [13]

3.3.1. Repetibilidade

O parâmetro da repetibilidade diz respeito à precisão de um método de ensaio realizado para uma matriz nas mesmas condições operacionais. Desta forma, espera-se que os ensaios sejam executados no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento e o mesmo tipo de reagentes, em curtos intervalos de tempo. É determinada através do estudo de uma série de n medições sobre a mesma matriz ou padrão, cobrindo todos os níveis de concentração e domínios de aplicação do método.

Primeiramente é necessário examinar se nos resultados obtidos nas n medições existem valores com afastamento em relação aos restantes, ou se apresentam valores anormais, designados de *outliers*, aplicando o teste de *Grubbs* que está apresentado no **Anexo 1**.

A repetibilidade é apresentada como o desvio padrão associado à média dos resultados obtidos e o limite de repetibilidade é o valor máximo permitido para a diferença entre dois ensaios obtidos em condições de repetibilidade (r), calculada para o nível de confiança a 95 %, através da **Equação 1**. [13]

$$r = 2,8 \sqrt{S_{ri}^2}$$

Equação 1

em que, 2,8 é o fator crítico¹ e S_{ri} a variância de repetibilidade associada aos resultados considerados.

¹ **Nota 1:** O limite de repetibilidade é aplicado à diferença entre dois resultados obtidos e apresenta um desvio padrão associado de $t\sqrt{n}$. Assumindo uma distribuição normal, o valor tabelado de t para $n = 2$, com uma probabilidade de 95% é de 1,96. Sendo então $1,96 \times \sqrt{2} = 2,7719$. Daqui surge o valor crítico 2,8, considerado razoável segundo a ISO 5725-6:94.

Desta forma, os duplicados de determinações efetuadas em condições de repetibilidade só são aceites se a diferença entre os dois valores e (x_{i1} e x_{i2}) for menor que r , ou seja $|x_{i1} - x_{i2}| \leq r$.

Contudo, em contexto de laboratório, onde se trabalha com amostras em gamas de trabalho e matrizes variadas, não é praticável utilizar o r calculado para cada uma das matrizes, pois seria necessário uma base de dados enorme. Assim, o mais habitual quando se trata de um método interno, é estabelecer o limite de repetibilidade por gama de trabalho.

Através do estudo do teste de *Cochran* (ou teste Q) é possível verificar a homogeneidade de variâncias em conjuntos de resultados de diferentes amostras com o mesmo número de repetições, o que permite selecionar as gamas de trabalho a partir das diferenças encontradas nas variâncias. No **Anexo 2** é apresentado a forma como se aplica este teste.

Após aplicação do teste determina-se o limite de repetibilidade da gama de trabalho ($r_{\text{gama de trabalho}}$) e o limite de repetibilidade relativo (r_{relativo}), através das **Equações 2 e 3**, respetivamente.

$$r_{\text{gama de trabalho}} = \frac{\sum r}{n}$$

Equação 2

$$r_{\text{relativo}}(\%) = \frac{\sum \frac{r}{\bar{x}_i}}{n} \times 100$$

Equação 3

em que, n é o número de matrizes analisadas, r é o limite de repetibilidade calculado para cada matriz, e \bar{x}_i a média de cada um dos conjuntos de valores.

A Silliker Portugal desenvolveu e implementou o impresso da qualidade IQ.22 Estudo da Repetibilidade. Este está preparado para executar o teste de *Grubbs*, o teste de *Cochran* e calcular o limite de repetibilidade para cada uma das matrizes estudadas e a gama de trabalho. No **Anexo 3** é apresentado o esquema da página de cálculo utilizada para este fim.

3.3.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia consiste na avaliação de resultados obtidos no mesmo laboratório, mas em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos

diferentes. Esta é a forma mais representativa da variabilidade de resultados num laboratório.

Existem diferentes formas para estudar a precisão intermédia, sendo que no laboratório da Silliker realiza-se através de duplicados ou em ensaio único, de amostras de clientes e/ou materiais de referência certificados.^[14]

A precisão intermédia estudada neste trabalho será através de duplicados..

O limite de precisão intermédia (pi) para um conjunto de duplicados é dado pela **Equação 4**.^[13]

$$pi = \frac{2,8 \times S_{pi}}{\bar{x}}$$

Equação 4

em que, 2,8 é o fator crítico (ver **Nota 1**), S_{pi} é o desvio padrão de precisão intermédia, e \bar{x} a média dos valores considerados.

O laboratório desenvolveu o impresso de qualidade IQ.29 Cálculo de Precisão Intermédia para ensaios em duplicado. No **Anexo 4** está apresentado o esquema da página de cálculo IQ.29.

3.4. Exatidão

A exatidão representa a proximidade do resultado obtido em relação ao valor de referência, convencionalmente aceite como verdadeiro. A avaliação deste parâmetro analítico pode ser feita com recurso a materiais de referência certificados, participação nos ensaios interlaboratoriais e a testes comparativos, como é praticado na Silliker Portugal. Na secção seguinte, 4, serão abordados estes tópicos.^[13]

A exatidão e a precisão são cruciais na validação de métodos analíticos. O primeiro prevê que não existam erros sistemáticos inerentes ao processo, enquanto o segundo reflete a dispersão dos vários resultados individuais em relação ao valor médio estando ou não próximo do valor verdadeiro.^[15]

4. Sistema de controlo Interno

Para garantir a constante qualidade dos serviços, a Silliker rege-se por um plano de controlo interno de modo a que os resultados obtidos nos laboratórios se encontrem dentro dos critérios pretendidos. Com isto, a hipótese de ocorrência de erros é constantemente eliminada através de testes diários e periódicos, tanto intra como interlaboratoriais. Esta competência de autodisciplina possibilita um maior rigor profissional que é também avaliado com a realização de auditorias internas.

4.1. Amostra de controlo diário do Processo

Os DPCS, ou Daily Process Control Sample, são amostras internas que visam avaliar os resultados das análises obtidos durante um dia de trabalho. Todos os dias é necessário a análise de um DPCS, para cada método, onde no final os resultados serão introduzidos na plataforma ZETA SAFE. Esta plataforma interna permite a monitorização dos parâmetros de precisão e exatidão, verificados através de cartas de controlo determinadas para cada um dos métodos em que o DPCS é aplicado. Os resultados das amostras realizadas nesse dia são validados se os valores do DPCS estiverem dentro dos limites estabelecidos. ^[13]

4.1.1. Cartas de Controlo

O controlo contínuo sobre os resultados obtidos é feito com recurso a cartas de controlo onde a deteção de eventuais erros é eficaz com a representação gráfica. As cartas de controlo podem ser dos seguintes tipos: cartas de Shewhart, em que se representa a variação de um critério em função do tempo; cartas de controlo de amplitudes, em que controla a amplitude dos valores obtidos para ensaios repetidos; cartas de controlo de somas cumulativas, em que se representa o somatório dos desvios observados relativamente ao valor esperado. Na Silliker, são utilizadas as cartas de controlo de amplitude, que são obtidas através da plataforma interna automática, ZETA SAFE. ^[16]

4.2. Amostras em duplicado

Para a deteção de erros acidentais e de modo a controlar a repetibilidade dos ensaios, a análise de amostras em duplicado é uma ferramenta decisiva. Os duplicados não permitem avaliar a exatidão, pois caso haja um erro sistemático, ambos os duplicados irão ser afetados. ^[13]

É recomendado para análises com vários passos e várias fontes de erro, sendo essencial que entre 5 a 10% das análises sejam submetidas a este teste. Assim, realiza-se um duplicado de amostra por cada dez amostras de clientes analisadas. A partir do software interno é estimada a diferença entre os duplicados, sendo que não pode ser superior à variação permitida pelo procedimento. Esta variação é dada pelo limite de repetibilidade, definido em procedimentos normalizados ou estabelecido para métodos internos, no processo de validação dos mesmos.^[17]

4.3. Amostras cegas

A fim de conhecer e avaliar o desempenho dos analistas e a precisão dos resultados, são usadas amostras-cegas cujos teores são conhecidos pelos responsáveis técnicos da qualidade do laboratório, sendo que, os analistas que irão executar o método pensam tratar-se de amostras de clientes. A sua utilização deverá ser regular e conjugada com amostras em duplicado. Na Silliker, este parâmetro é avaliado através da participação em circuitos de comparação interlaboratorial.^[13]

Geralmente, a avaliação dos resultados alcançados, para um dado método, é considerada aceitável quando a diferença entre o valor obtido e o valor aceite como verdadeiro é inferior à precisão intermédia estabelecida para um dado método.^[17]

4.4. Ensaio de Comparação Interlaboratorial

Um Ensaio de Comparação Interlaboratorial (ECI) envolve a organização, realização e avaliação de ensaios da mesma amostra por dois ou mais laboratórios, em condições pré-definidas. O ECI pode ser classificado como: de normalização, certificação e de aptidão, também estes designados por Testes de Proficiência (TP). Atendendo ao trabalho desenvolvido, apenas serão abordados os ensaios interlaboratoriais de aptidão.^[13,18]

Segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025, a realização de ECI é um requisito para garantir a qualidade dos resultados obtidos, pois permite avaliar o desempenho dos laboratórios participantes.^[19]

No Controlo da Qualidade (CQ) estes ensaios são fundamentais, pois com eles é possível detetar erros sistemáticos; implementar ações corretivas e preventivas após análise dos resultados obtidos; demonstrar a competência técnica do analista e do método perante terceiros, competência esta reconhecida a nível nacional e internacional; e permitem avaliar o desempenho de um método, sendo também

utilizados como ferramenta de validação. Com isto, o estudo da incerteza feito neste trabalho são feitos a partir da avaliação dos ensaios de aptidão. ^[20]

Como já foi referido, a Silliker participa em circuitos internos de ensaio interlaboratorial do grupo Mérieux. Os mesmos são organizados pela Silliker Lab Products que tem como responsabilidade a preparação, homogeneização, embalagem e distribuição das amostras. Estas amostras são fornecidas pela AOAC (Official Methods of Analysis), entidade acreditada de acordo com a norma ISO/IEC Guide 43-1:1997.

Além disso, o laboratório FQ da empresa participa em diversos testes de proficiência (TP), organizados por entidades consideradas validas pelo IPAC como: BIPEA, FAPAS, LGC e Inter2000.

4.4.1. Avaliação do Desempenho

Para avaliar o desempenho de um método em testes de proficiência é utilizado o parâmetro *Z-score* (Z), calculado segundo a **Equação 5**. ^[11]

$$Z = \frac{X_{lab} - X_{Ref}}{s} V_1$$

Equação 5

em que, X_{lab} é o valor obtido pelo laboratório, X_{Ref} o valor aceite como verdadeiro ² e s o desvio padrão ³.

De modo a demonstrar um desempenho favorável, o laboratório necessita que o valor de *Z-score* esteja contido no intervalo $[-2; 2]$, sendo importante salientar que quanto mais próximo de 0, mais exato é o resultado obtido. Os valores negativos demonstram que o valor obtido é inferior ao valor aceite como verdadeiro e, os positivos, indicam que são superiores. Na **Figura 5** é apresentado o sistema de avaliação do desempenho utilizando o valor de *Z-score*.

² **Nota 2:** O valor aceite como verdadeiro X_{Ref} pode ser o valor certificado de um material de referência certificado (MRC), ou o valor estabelecido no ensaio laboratorial por média dos resultados obtidos, após exclusão dos valores aberrantes.

³ **Nota 3:** O desvio padrão s pode ser o desvio padrão associado ao MRC; a incerteza do valor aceite como verdadeiro; ou o desvio padrão da média dos valores obtidos pelos laboratórios, após eliminar os valores aberrantes. Este desvio é designado como desvio padrão robusto, e é o utilizado pela Silliker Portugal.

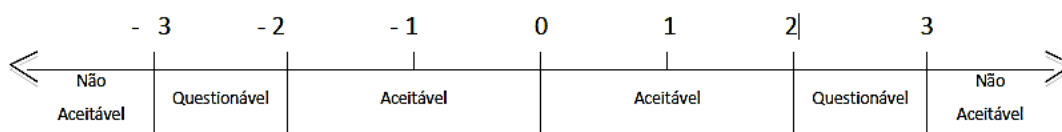


Figura 5 - Avaliação do desempenho com Z-score. Adaptado de [11]

No caso da obtenção de valores fora dos limites, ou seja, inferiores a -2 ou superiores a 2, o laboratório deverá elaborar um plano de ações corretivas. Desta maneira, a pesquisa das causas será fundamental, bem como, a sua correção e nova avaliação.^[11]

5. Estudo da Estimativa da Incerteza

A estimativa da incerteza avalia a dispersão de valores que podem ser atribuídos ao ensaio. Isto significa que para amostras de cliente, como o valor verdadeiro é desconhecido, a incerteza associada ao resultado é uma medida para a precisão do mesmo. Por essa razão, a incerteza é, em muito casos, confundida com o erro de um resultado que se define como a “diferença entre o valor obtido e o valor convencionalmente aceite como verdadeiro”.^[21,22]

A norma NP EN ISO/IEC 17025 determina que os laboratórios devem aplicar metodologias para estimar a incerteza de medição para cada método, cabendo assim ao laboratório escolher qual o mais adequado face aos recursos e dados de validação disponíveis. A Silliker Portugal para este fim estabeleceu o impresso da qualidade IQ.292 Estudo da Estimativa da Incerteza (**Anexo 5**), que permite uniformizar e otimizar o processo de avaliação deste parâmetro. Este impresso da qualidade foi elaborado com base no documento “Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories”, da NORDTEST.^[23] Como já foi referido, para este trabalho a incerteza é calculada com base nos resultados interlaboratoriais.

Durante toda a execução de um procedimento de análise química existem diversas fontes de erro como: homogeneização e diluição da amostra de laboratório, desvios de instrumentos e calibração, fatores humanos e ambientais. Por essa razão, é necessário que a incerteza seja calculada com base em todas as possíveis fontes de incerteza.

Em casos gerais, a determinação da incerteza é feita a partir de todas as contribuições de fontes de erro, aplicando-se as leis de propagação de erros. Contudo,

em contexto de laboratório de ensaio esta técnica não é realizável, pois os métodos são extensos e complexos. Portanto, a determinação deve ser efetuada como a estimativa da “incerteza global”, analisando os resultados interlaboratoriais. [22,23]

A incerteza está associada à incerteza da exatidão (u_{Er}), e à da precisão ($u_{Srelativo}$), ou seja, a “incerteza global” é a combinação da incerteza relativa da componente de precisão e exatidão, segundo a **Equação 6**.

$$u_{relativa} = \sqrt{u_{Srelativo}^2 + u_{Er}^2}$$

Equação 6

Para apresentar a incerteza com um grau de confiança de 95 % ($k = 2$), determina-se a incerteza expandida ($U_{expandida}$) através da **Equação 7**.

$$U_{expandida} = k \times u_{relativa}$$

Equação 7

Ambas as abordagens, interlaboratorial ou intralaboratorial, têm em comum a estimativa da componente da precisão ser calculada com base nos desvios padrão de precisão intermédia, obtidos durante o processo de validação e/ou obtidos através de cartas de controlo do método, estabelecidas e suportadas pelo CQ. Na **Tabela 3** são apresentadas os conceitos necessários para estimar esta componente e as equações correspondentes.

Tabela 3 – Cálculo da componente da incerteza associada à precisão intermédia do método, para o estudo da estimativa da “incerteza global”. Adaptado de [23,24]

Componente de Incerteza associada à precisão do Método	
Incerteza combinada dos desvios padrão considerados ($u_{Srelativo}$)	$u_{Srelativo} = \sqrt{\frac{\sum S_{relativo}}{n}}$ Equação 8
Desvio padrão relativo ($S_{relativo}$)	$S_{relativo} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$ Equação 9
Em que, n é o número de conjunto de dados considerados, s é o desvio padrão associado a cada uma das populações consideradas, e \bar{x} o valor médio dos dados considerados.	

CAPÍTULO III

Execução Experimental

Os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos no laboratório da Silliker Portugal S.A., referentes à validação dos métodos Determinação da Acidez PAFQ.197 e Determinação da Fibra Alimentar PAFQ.230.

É importante referir que, dado a confidencialidade perante os métodos internos, será apenas mencionado o necessário para a compreensão dos conteúdos apresentados, fazendo apenas referência ao princípio do método.

Durante o trabalho laboratorial, todos os ensaios foram praticados de acordo com os procedimentos estabelecidos no laboratório de FQ, de forma a garantir que os ensaios fossem praticados de igual maneira do seu dia-a-dia.

Os ensaios foram realizados maioritariamente por mim, tendo sempre a analista qualificada do método a verificar todo o meu trabalho. Em todos os ensaios foram usados DPCS de forma a garantir que os resultados obtidos por mim eram equivalentes aos obtidos pela analista.

No caso da Determinação de Acidez, o método é feito por titulação e, uma vez que é difícil a perceção do ponto de viragem para algumas amostras e, de forma a garantir que todos os ensaios são analisados de igual modo, apenas a analista qualificada efetuou as determinações.

No método da Determinação da Fibra Alimentar, os ensaios foram sempre programados pela analista para uma melhor gestão de equipamentos.

Os duplicados estão atualmente integrados no processo de validação de um método. Para fins de Controlo Qualidade (CQ), por cada 10 amostras analisadas, para um determinado método, uma das amostras tem de ser realizado em duplicado. Este procedimento garante a precisão da série de trabalho aquando a execução do método. Desta forma, quando é necessário a validação de um método recorre-se aos resultados gravados dos duplicados para a avaliação da precisão intermédia. Com isto é possível a redução do número de ensaios a realizar durante o processo de validação.

Com o aumento do número e tipo de matrizes para análise, o processo de validação recorreu ao uso de amostras de cliente para representar melhor a adequação do método ao uso pretendido. Assim, as amostras escolhidas para cada plano de validação foram de acordo com o tipo de amostras analisadas diariamente.

Em conclusão, o processo de validação deve ser determinado e adaptado ao método em questão. Na **Figura 6** está sintetizado o processo de validação seguido durante este estágio.

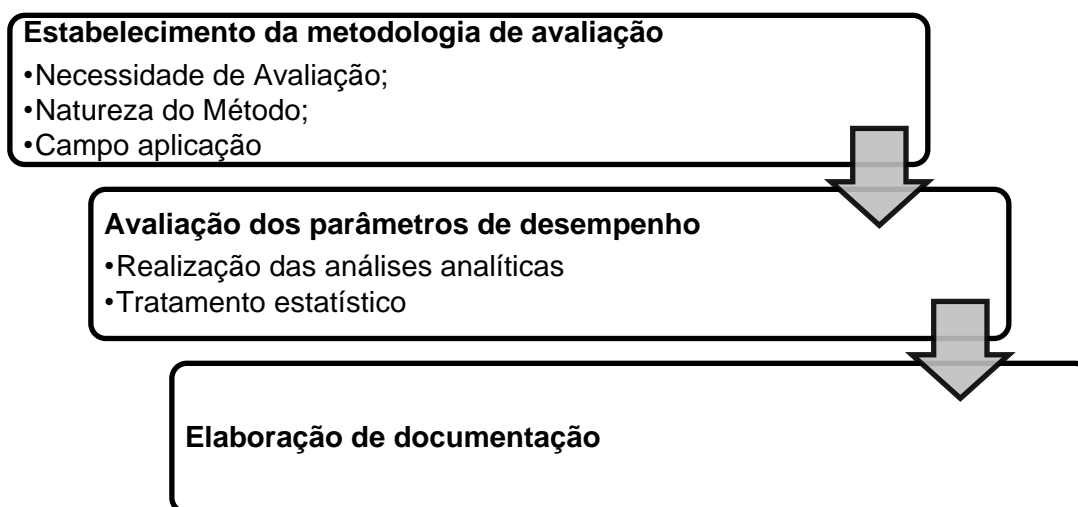


Figura 6 – Demonstração do processo de validação usado durante o estágio.

Na **Tabela 1** do Capítulo I foram apresentados os grupos alimentares considerados na empresa Silliker Portugal, que irá servir de orientação ao longo do trabalho. Como já foi referido, para cada método foi elaborado um plano de validação onde foram escolhidas amostras conforme a frequência de análise.

De forma a garantir a homogeneidade da amostra a estudar, a primeira etapa de todo o processo de validação passa pela preparação de amostra.

1. Preparação de Amostras

Para que o resultado do ensaio seja credível e de confiança, a homogeneidade da amostra a ser analisada é fundamental. Assim, a etapa de preparação de amostras é responsável pela preparação adequada à análise em vista, seguindo as metodologias definidas pelo laboratório. ^[25]

Com isto, a Silliker desenvolveu uma série de procedimentos de gestão das amostras (PGQ.08) e de métodos de preparação das amostras para análise (PAFQ.044). Na **Figura 7** é possível verificar as funções de cada um deles.

PCQ.08

- Transporte
- Recepção
- Manuseamento
- Proteção
- Armazenamento

PAFQ.044

- Preparação
- Homogeneização
- Conservação

Figura 7 – Funções associadas aos procedimentos de preparação de amostras desenvolvidos pela Silliker.

Deve sempre preparar-se a amostra conforme a mesma é consumida, não rejeitando nenhum elemento, permitindo assim informar corretamente o cliente.^[26]

Na generalidade dos casos, as amostras sólidas ou semi-sólidas são trituradas para diminuir o tamanho das partículas, usando trituradoras automáticas. No caso de amostras secas, como arroz, feijão, café, são picadas num moinho granulador, o qual tem diferentes peneiros consoante a amostra a preparar.^[27]

No caso de produtos líquidos que possam ser homogeneizados na própria embalagem (néctar, sumo de laranja), deve-se agitar a amostra por meio de movimentos verticais. Quando se retira a amostra da embalagem de origem deve-se verificar sempre se não restam quaisquer resíduos e/ou depósitos nesta. As bebidas que contenham dióxido de carbono devem ser desgaseificadas antes da análise, recorrendo a um banho de ultra-sons. No caso das cervejas habitualmente, também se recorre a uma filtração para remover o dióxido de carbono. Existem amostras que necessitam ser submetidas a um banho de água quente, garantindo que não ficam partículas no fundo da embalagem.^[26]

2. Validação do método: Determinação da Acidez – PAFQ.197

2.1. Objetivo da Validação

Como já referido, o principal objetivo da empresa foi transformar a NP-1421 Determinação da Acidez em Géneros alimentícios derivados de frutas e de produtos Hortícolas num Procedimentos de Análises Físico-Químicas (PAFQ). Com esta alteração, a validação do novo PAFQ. 197 passaria a ser obrigatória.

2.2. Resumo da metodologia

A metodologia para a validação deste método (determinação da acidez) consistiu na análise de:

- Amostras analisadas pelo laboratório de Físico-Química da SILLIKER Portugal.
- Amostras provenientes de ensaios de comparação interlaboratorial.

2.3. Princípio do método

Titulação potenciométrica ou à viragem da fenolftaleína como indicador, em meio aquoso, com a solução 0,1 N de hidróxido de sódio. Na **Figura 8** está representado um esquema que sintetiza este método.



Figura 8 - Esquema de determinação de acidez, pelo método de titulação.

2.4. Plano de validação

Para que a avaliação do desempenho do método cobrisse toda a gama de trabalho e todo o tipo de matrizes analisadas (maioritariamente) neste método, recorreu-se ao historial de análises deste método, através de consulta no software interno da Silliker Portugal. Conforme mostra a **Tabela 3** foram seleccionadas 10 matrizes distintas.

Tabela 4 – Matrizes escolhidas para a Validação do método da Determinação de Acidez PAFQ.197.

Grupo	Matrizes
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Caramelos
	Rebuçados
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Pizza Fresca
Bebidas não alcoólicas	Água Tónica
	Diet Soda
	Bebida Enegetica
Carnes, produtos cárneos e derivados	Sangue
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Pão de Forma
	Pão de Leite
	Pastelaria

2.5. Cálculos

A acidez do produto expressa em cm³ de solução alcalina normal por 100 cm³ ou 100 g de produto é dada pela **Equação 10**.

$$100 \frac{V_2}{V_1}$$

Equação 10

em que, V_1 é o volume da toma para análise, expresso em centímetros cúbicos e V_2 o volume da solução de hidróxido de sódio, expresso em centímetros cúbicos, gasto na determinação;

A acidez pode ser expressa, convencionalmente, em gramas dos seguintes ácidos orgânicos, por 100 cm³ ou 100 g, multiplicando-os pelos fatores:

- 0,064 para o ácido cítrico anidro;
- 0,070 para ácido cítrico monoidratado;
- 0,067 para ácido málico;
- 0,075 para ácido tartárico;
- 0,090 para ácido láctico;
- 0,033 para ácido fosfórico;
- 0,060 para ácido acético;

3. Validação do método: Determinação da Fibra Alimentar - PAFQ.230

3.1. Objetivo da validação

É um exemplo de um método implementado na Silliker Portugal, e como tal consta no plano de validações do laboratório. De 4 em 4 anos, os métodos devem ser revalidados com o objetivo de atualizar as evidências que demonstram que o procedimento técnico continua apto para o uso pretendido. Ou seja, com esta validação pretende-se definir os novos parâmetros de desempenho deste método analítico.

3.2. Resumo da metodologia

A metodologia para a validação deste método (determinação da fibra alimentar) consistiu na análise de:

- Amostras analisadas pelo laboratório de Físico-Química da SILLIKER Portugal.
- Amostras provenientes de ensaios de comparação interlaboratorial.

3.3. Princípio do método

Este método permite determinar o teor de fibra total, de fibra solúvel e de fibra insolúvel de um alimento utilizando uma combinação de técnicas analíticas enzimáticas e gravimétricas. O teor de fibra alimentar total (Total Dietary Fiber –TDF) corresponde à soma da fibra alimentar solúvel (SDF) e fibra alimentar insolúvel (IDF). Cada um destes grupos de fibra alimentar (TDF, SDF e IDF) é obtido através de um processo de filtração distinto após ataque enzimático da amostra.

O método é aplicado a um único extrato de amostra previamente desengordurada (se o teor de matéria gorda da amostra for superior a 10%) e seca. A

amostra é aquecida a 100°C na presença da α -amilase termoestável até à gelatinização, hidrólise e despolimerização do amido. Em seguida é incubada a 60°C na presença de protéase (para solubilizar e despolimerizar as proteínas) e de amiloglucosidase (afim de hidrolisar os restos de etanol para precipitar as fibras solúveis e eliminar as proteínas e glucose despolimerizadas. O resíduo é filtrado e lavado com etanol a 78%, etanol a 96% e acetona e em seguida seco e pesado. Para a SDF e IDF, o resíduo resultante do ataque enzimático é diretamente filtrado, lavado com água quente, seco e pesado. Para a determinação de SDF, as águas de lavagem e o filtrado são combinados e precipitados com etanol, filtrados, secos e pesados.

Em todos os casos, uma amostra de resíduo seco é utilizada para a determinação da proteína pelo método de DUMAS e o resto do resíduo é calcinado a (525 \pm 25) °C. Os teores de TDF, SDF e IDF correspondem ao peso do resíduo após filtração e secagem ao qual subtrai os pesos dos resíduos de proteína e cinza. Na **Figura 9** está representado um esquema que sintetiza este método.

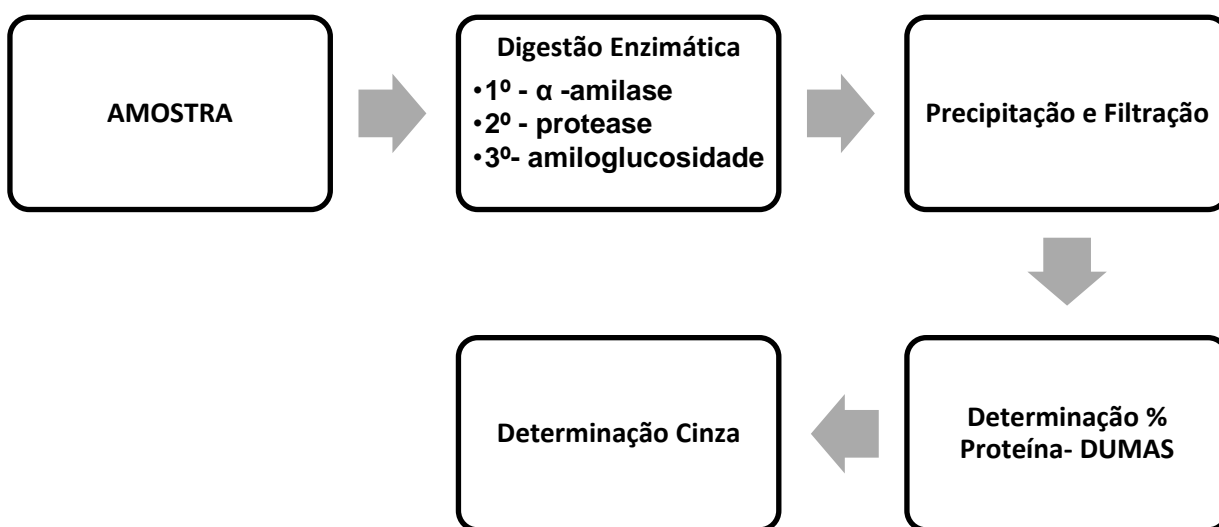


Figura 9 - Esquema de determinação da fibra alimentar, pelo método enzimático.

3.4. Plano de validação

Como referido anteriormente, este procedimento interno é aplicado a diversos domínios alimentares e, como tal, todos eles devem ser estudados. Para seleccionar as

matrizes a serem estudadas durante o processo de validação, recorreu-se ao historial do método, através do software interno. Realizou-se o levantamento de matrizes que foram analisadas no último ano para determinação do teor de fibra e, assim, conseguiu-se garantir que todos os domínios alimentares são cobertos na validação. Na **Tabela 4** é possível verificar as matrizes escolhidas para este plano de validação.

Tabela 5 – Matrizes escolhidas para a Validação do método da Determinação de Fibra Alimentar PAFQ.230.

Grupo	Exemplo de Matrizes	Analisada
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Preparado para Pudim	SIM
	Marmelada	NÃO
	Chocolate Preto	NÃO
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Paté	SIM
	Molho piripiri	SIM
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Farinha Láctea	SIM
	Levedura de cerveja	NÃO
	Suplemento Alimentar	SIM
Bebidas alcoólicas	Panaché	SIM
Bebidas não alcoólicas	Bebida de soja	SIM
	Sumo	NÃO
	Batido	NÃO
Café, chá, infusões e derivados	Café solúvel	SIM
	Infusão	SIM
	Café torrado grão	NÃO
Carnes, produtos cárneos e derivados	Alheira	NÃO
	Salsicha	SIM
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Arroz	SIM
	Leguminosas Secas	SIM
	Farelo	NÃO

Especiarias, condimentos e derivados	Vinagre	NÃO
	Mostarda	SIM
	Especiarias	SIM
Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados	Rebentos	NÃO
	Tremoço em Conserva	SIM
	Fruta desidratada	SIM
Gorduras, óleos, sementes oleaginosas e derivados	Azeite virgem extra	SIM
	Maionese	NÃO
	Sementes oleaginosas	NÃO
Leite, produtos lácteos e derivados	Leite com Chocolate	NÃO
	Queijo	SIM
	Manteiga	SIM
Ovos e derivados	Ovo Líquido	SIM
Produtos da pesca e derivados	Sardinha em conserva	SIM
	Conserva de peixe	SIM

Contudo, devido ao elevado número de amostras para clientes, o uso dos aparelhos foi bastante dificultado não conseguindo assim proceder ao estudo de todas as matrizes alimentares. No entanto, para a elaboração deste relatório o número de amostras analisadas é suficiente para uma análise estatística.

3.5. Cálculos

O método da fibra é muito complexo uma vez que a preparação da amostra varia consoante teor de gordura e/ou açúcar. Desta forma, os cálculos para a determinação de fibra são feitos de acordo com os pré-tratamentos estabelecidos.

A fibra (total, solúvel e insolúvel), expressa em g/100 g, é calculada a partir da **Equação 11**.

$$Fibra = \frac{massa_{resíduo\ seco} - massa_{cinza} - massa_{proteína} - massa_{branco} \times Fator}{massa_{toma}} \times 100$$

Equação 11

em que, todas as massas estão expressas em gramas; a $massa_{branco}$ é a massa do ensaio em branco, depois de subtraídas as respectivas massas de proteína e cinza; e o $Fator$ é o fator de preparação a que foi sujeita a amostra.

CAPÍTULO IV

Resultados e Conclusões

1. Resultados da Validação do método: Determinação da Acidez – PAFQ.197

Os resultados obtidos para cada um dos ensaios realizados estão apresentados no **Anexo 6**.

1.1. Precisão

1.1.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada com a realização de 8 ensaios para cada uma das matrizes, em condições de repetibilidade. Depois de analisar os resultados obtidos verificou-se uma dispersão dos mesmos e assim os resultados tiveram de ser divididos por gama de trabalho para uma melhor avaliação. É de relembrar que para este método existem diferentes maneiras de expressar os resultados, nomeadamente:

- NaOH 1N
- Ácido Lático;
- Ácido Acético;
- Ácido Fosfórico;
- Ácido Cítrico anidro;
- Ácido Cítrico monoidratado;
- Ácido Málico;
- Ácido Tartárico;

Como tal irão ser avaliados os resultados para cada um deles.

Com recurso ao impresso da qualidade IQ.22 Estudo da Repetibilidade (**Anexo 3**), avaliaram-se os dados obtidos, apresentados no **Anexo 6**. Foram aplicados os testes de *Grubbs* e *Cochran* e, como seria de esperar, este teste demonstra que as variâncias obtidas no estudo da repetibilidade diferem significativamente entre elas. Isto acontece devido à natureza variada das amostras e aos diferentes teores de acidez, quanto maior o teor maior será a variância observada no conjunto de dados. Assim, foram estabelecidas gamas de trabalho para cada forma de expressar a acidez, em que os conjuntos de dados inseridos em cada gama apresentam homogeneidade de variâncias, de acordo com o teste de *Cochran*. Nas **Tabelas 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13** estão apresentados os resultados depois de aplicado este teste. Na **Tabela 14** estão apresentadas as conclusões finais.

Tabela 6 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em **NaOH 1N**.

Teor de Acidez ml/100 g	Matriz	Média	Variância de Repetibilidade	Limite da Repetibilidade
< 5,00	Caramelos	0,78	0,001321	0,101766
	BIPEA 2016 - Diet soda	2,43	0,001133	0,094255
	Sangue	0,33	0,000343	0,051840
	Pão de leite	4,43	0,003395	0,163156
	Pastelaria	1,16	0,001988	0,124828
≥ 5,00	Rebuçados	12,78	0,009518	0,273162
	Água tônica	6,46	0,004186	0,181164
	Bebida energética	9,64	0,005956	0,216088

Tabela 7 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em **Ácido Láctico**.

Teor de Acidez ml/100 g	Matriz	Média	Variância de Repetibilidade	Limite da Repetibilidade
< 0,50	Caramelos	0,07	0,000011	0,009159
	BIPEA 2016 - Diet soda	0,22	0,000009	0,008483
	Sangue	0,03	0,000003	0,004666
	Pão de leite	0,40	0,000028	0,014684
	Pastelaria	0,10	0,000016	0,011235
≥ 0,50	Rebuçados	1,15	0,000077	0,024585
	Água tônica	0,58	0,000034	0,016305
	Bebida energética	0,87	0,000048	0,019448

Tabela 8 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em **Ácido Acético**.

Teor de Acidez ml/100 g	Matriz	Média	Variância de Repetibilidade	Limite da Repetibilidade
< 0,30	Caramelos	0,05	0,000005	0,006106
	BIPEA 2016 - Diet soda	0,15	0,000004	0,005655
	Sangue	0,02	0,000001	0,003110
	Pão de leite	0,27	0,000012	0,009789
	Pastelaria	0,07	0,000007	0,007490
≥ 0,30	Rebuçados	0,77	0,000034	0,016390
	Água tônica	0,39	0,000015	0,010870
	Bebida energética	0,58	0,000021	0,012965

Tabela 9 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em **Ácido Fosfórico**.

Teor de Acidez ml/100 g	Matriz	Média	Variância de Repetibilidade	Limite da Repetibilidade
< 0,20	Caramelos	0,03	0,000001	0,003358
	BIPEA 2016 - Diet soda	0,08	0,000001	0,003110
	Sangue	0,01	0,000000	0,001711
	Pão de leite	0,15	0,000004	0,005384
	Pastelaria	0,04	0,000002	0,004119
≥ 0,20	Rebuçados	0,42	0,000010	0,009014
	Água tônica	0,21	0,000005	0,005978
	Bebida energética	0,32	0,000006	0,007131

Tabela 10 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em **Ácido Cítrico Anidro**.

Teor de Acidez ml/100 g	Matriz	Média	Variância de Repetibilidade	Limite da Repetibilidade
< 0,30	Caramelos	0,050	0,000005	0,006513
	BIPEA 2016 - Diet soda	0,16	0,000005	0,006032
	Sangue	0,02	0,000001	0,003318
	Pão de leite	0,28	0,000014	0,010442
	Pastelaria	0,07	0,000008	0,007989
≥ 0,30	Rebuçados	0,82	0,000039	0,017482
	Água tônica	0,41	0,000017	0,011594
	Bebida energética	0,62	0,000024	0,013830

Tabela 11 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em **Ácido Cítrico Monohidratado**.

Teor de Acidez ml/100 g	Matriz	Média	Variância de Repetibilidade	Limite da Repetibilidade
< 0,40	Caramelos	0,05	0,000006	0,007124
	BIPEA 2016 - Diet soda	0,17	0,000006	0,006598
	Sangue	0,02	0,000002	0,003629
	Pão de leite	0,31	0,000017	0,011421
	Pastelaria	0,08	0,000010	0,008738
≥ 0,40	Rebuçados	0,89	0,000047	0,8946
	Água tônica	0,45	0,000021	0,452
	Bebida energética	0,68	0,000029	0,675

Tabela 12 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em **Ácido Málico**.

Teor de Acidez ml/100 g	Matriz	Média	Variância de Repetibilidade	Limite da Repetibilidade
< 0,40	Caramelos	0,05	0,000006	0,006818
	BIPEA 2016 - Diet soda	0,16	0,000005	0,006315
	Sangue	0,02	0,000002	0,003473
	Pão de leite	0,30	0,000015	0,010931
	Pastelaria	0,08	0,000009	0,008363
≥ 0,40	Rebuçados	0,86	0,000043	0,018302
	Água tônica	0,43	0,000019	0,012138
	Bebida energética	0,65	0,000027	0,014478

Tabela 13 - Média do teor da acidez, variância e limite de repetibilidade para os resultados da acidez expressos em **Ácido Tartárico**.

Teor de Acidez ml/100 g	Matriz	Média	Variância de Repetibilidade	Limite da Repetibilidade
< 0,40	Caramelos	0,06	0,000006	0,007632
	BIPEA 2016 - Diet soda	0,18	0,000005	0,007069
	Sangue	0,03	0,000002	0,003888
	Pão de leite	0,33	0,000015	0,012237
	Pastelaria	0,09	0,000009	0,009362
≥ 0,40	Rebuçados	0,96	0,000054	0,020487
	Água tônica	0,48	0,000024	0,013587
	Bebida energética	0,72	0,000034	0,016207

Tabela 14 - Limite de repetibilidade e limite de repetibilidade relativo, associado a cada uma das gamas de acidez estabelecidas, para o método interno PAFQ.197

Determinação de Acidez.

Acidez, expressa	Gama de trabalho (mL/100g)	Limite Repetibilidade de	Limite Repetibilidade Relativo (%)	Minorado ou Majorado (%)
NaOH 1N	< 5,00	0,1072	9,4255	9,00
	≥ 5,00	0,2235	2,3950	3,00
Ácido Láctico;	< 0,50	0,0096	9,4255	9,00
	≥ 0,50	0,0201	2,3950	3,00
Ácido Acético;	< 0,30	0,0064	9,4255	9,00
	≥ 0,30	0,0134	2,3950	3,00
Ácido Fosfórico;	< 0,20	0,0035	9,4255	9,00
	≥ 0,20	0,0074	2,3950	3,00
Ácido Cítrico anidro;	< 0,30	0,0069	9,4255	9,00
	≥ 0,30	0,0143	2,3950	3,00
Ácido Cítrico monoidratado;	< 0,40	0,0075	9,4255	9,00
	≥ 0,40	0,0156	2,3950	3,00
Ácido Málico	< 0,40	0,0072	9,4255	9,00
	≥ 0,40	0,0150	2,3950	3,00
Ácido Tartárico	< 0,40	0,0080	9,5255	9,00
	≥ 0,40	0,0168	2,3950	3,00

1.1.2. Precisão Intermédia

A precisão intermédia foi estudada através da análise de cinco duplicados de cada amostra, durante cinco dias consecutivos. Os resultados obtidos foram tratados utilizando o impresso da qualidade IQ.29 Cálculo de precisão intermédia (**Anexo 4**). Na **Tabela 15** são apresentados os desvios padrão e o limite de precisão intermédia obtidos para cada gama de trabalho.

Tabela 15 - Desvio padrão e limite de precisão intermédia obtidos no estudo da precisão intermédia para o método da Determinação de Acidez PAFQ.197.

Acidez, expressa	g/100 g	Desvio padrão da precisão intermédia	Limite de precisão intermédia relativo (%)
NaOH 1N	< 5,00	0,099	12,0
	≥ 5,00	0,142	5,0
Ácido láctico	< 0,50	0,009	12,0
	≥ 0,50	0,013	5,0
Ácido acético	< 0,30	0,006	12,0
	≥ 0,30	0,009	5,0
Ácido fosfórico	< 0,20	0,003	12,0
	≥ 0,20	0,005	5,0
Ácido cítrico anidro	< 0,30	0,006	12,0
	≥ 0,30	0,009	5,0
Ácido cítrico monoidratado	< 0,40	0,007	12,0
	≥ 0,40	0,010	5,0
Ácido málico	< 0,40	0,007	12,0
	≥ 0,40	0,010	5,0
Ácido tartárico	< 0,40	0,007	12,0
	≥ 0,40	0,011	5,0

1.2. Exatidão

A exatidão foi demonstrada com base nos resultados obtidos da análise da amostra BIPEA 2016 – Diet soda. Os resultados encontram-se na **Tabela 16**.

Tabela 16 - Resultado obtido para a Exatidão, expresso em NaOH 1N, para o método Determinação de Acidez PAFQ.197.

Matriz	Valor medido (ml/100 ml)	Valor certificado (ml/100 ml)	Limite inferior (ml/100 ml)	Limite superior (ml/100 ml)	Avaliação da exatidão
BIPEA 2016 – Diet soda	2,43	2,59	2,39	2,79	OK

Conclusão: Com base nos ensaios realizados e nos resultados obtidos, demonstra-se que os valores de exatidão obtidos cumprem com os critérios estabelecidos para as matrizes analisadas.

1.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação é de 0,20 ml/100 g ou 0,20 ml/100 ml para a acidez expressa em NaOH 1N. Para as restantes formas de acidez, o limite de quantificação é de 0,02 ml/100 g ou 0,02 ml/100 ml.

1.4. Gama de trabalho

Os resultados expressos na **Tabela 17** foram calculados a partir do resultado do NaOH 1N multiplicando pelo fator de conversão para cada um dos ácidos apresentados.

Tabela 17 – Gama de trabalho para o método da Determinação de Acidez.

Acidez, expressa	Limite mínimo	Limite máximo
NaOH 1N	0,20	15,0
Ácido láctico	0,02	1,35
Ácido acético	0,02	0,90
Ácido fosfórico	0,02	0,50

Ácido cítrico anidro	0,02	0,96
Ácido cítrico monoidratado	0,02	1,05
Ácido málico	0,02	1,01
Ácido tartárico	0,02	1,13

1.5. Estimativa de Incerteza

Uma vez que só existem materiais de referência certificados que avaliam a acidez expressa em NaOH 1N, considera-se que a incerteza dos restantes ácidos é igual à incerteza da acidez expressa em NaOH 1N. Na **Tabela 18** é apresentado o valor da incerteza estimada.

Tabela 18 – Incerteza Relativa estimada para a validação do método da Determinação de Acidez PAFQ.197.

Acidez	Incerteza relativa estimada (%)
	15,0

1.6. Resultados

Os resultados apresentam-se arredondados às centésimas para valores iguais ou inferiores a 4,99 (ml/100 g ou ml/100 ml), para a acidez expressa em NaOH 1N. Os resultados apresentam-se arredondados às centésimas para valores iguais ou inferiores a 4,99 (ml/100 g ou ml/100 ml), para a acidez expressa em NaOH 1N. Para as restantes formas de acidez, os resultados apresentam-se arredondados às centésimas, para toda a gama de trabalho.

Na **Tabela 19** estão apresentados todos os resultados obtidos para a Validação do método Determinação da Acidez PAFQ.197.

Tabela 19 – Apresentação dos resultados finais para a Validação da Determinação de Acidez PAFQ.197

Critérios	Resultados obtidos				
Repetibilidade	Acidez	ml/100 g ou ml/100 ml	Limite de repetibilidade relativo (%)		
			Valor calculado	Valor majorado/ minorado	
		< 5,0	9,4255	9,00	
		≥ 5,0	2,3950	3,00	
Precisão intermédia	Acidez, expressa	g/100 g	Limite de precisão intermédia relativo (%)		
	NaOH 1N	< 5,00	12,0		
		≥ 5,00	5,0		
	Ácido láctico	< 0,50	12,0		
		≥ 0,50	5,0		
	Ácido acético	< 0,30	12,0		
		≥ 0,30	5,0		
	Ácido fosfórico	< 0,20	12,0		
		≥ 0,20	5,0		
	Ácido cítrico anidro	< 0,30	12,0		
		≥ 0,30	5,0		
	Ácido cítrico monoidratado	< 0,40	12,0		
		≥ 0,40	5,0		
	Ácido málico	< 0,40	12,0		
		≥ 0,40	5,0		
	Ácido tartárico	< 0,40	12,0		
		≥ 0,40	5,0		
	Exatidão	✓ Com base nos ensaios realizados e nos resultados obtidos, demonstra-se que os valores de exatidão obtidos cumprem com os critérios estabelecidos para as matrizes analisadas.			

Limite de quantificação	<ul style="list-style-type: none">✓ O limite de quantificação é de 0,20 ml/100 g ou 0,20 ml/100 ml para a acidez expressa em NaOH 1N.✓ Para as restantes formas de acidez, o limite de quantificação é de 0,02 ml/100 g ou 0,02 ml/100 ml.																													
Gama de trabalho	<table><tr><th>Acidez, expressa</th><th>Limite mínimo</th><th>Limite máximo</th></tr><tr><td>NaOH 1N</td><td>0,20</td><td>15,0</td></tr><tr><td>Ácido láctico</td><td>0,02</td><td>1,35</td></tr><tr><td>Ácido acético</td><td>0,02</td><td>0,90</td></tr><tr><td>Ácido fosfórico</td><td>0,02</td><td>0,50</td></tr><tr><td>Ácido cítrico anidro</td><td>0,02</td><td>0,96</td></tr><tr><td>Ácido cítrico monoidratado</td><td>0,02</td><td>1,05</td></tr><tr><td>Ácido málico</td><td>0,02</td><td>1,01</td></tr><tr><td>Ácido tartárico</td><td>0,02</td><td>1,13</td></tr></table>			Acidez, expressa	Limite mínimo	Limite máximo	NaOH 1N	0,20	15,0	Ácido láctico	0,02	1,35	Ácido acético	0,02	0,90	Ácido fosfórico	0,02	0,50	Ácido cítrico anidro	0,02	0,96	Ácido cítrico monoidratado	0,02	1,05	Ácido málico	0,02	1,01	Ácido tartárico	0,02	1,13
Acidez, expressa	Limite mínimo	Limite máximo																												
NaOH 1N	0,20	15,0																												
Ácido láctico	0,02	1,35																												
Ácido acético	0,02	0,90																												
Ácido fosfórico	0,02	0,50																												
Ácido cítrico anidro	0,02	0,96																												
Ácido cítrico monoidratado	0,02	1,05																												
Ácido málico	0,02	1,01																												
Ácido tartárico	0,02	1,13																												
Incerteza	<table><tr><td rowspan="2">Acidez</td><td>Incerteza relativa estimada (%)</td></tr><tr><td>15,0</td></tr></table>			Acidez	Incerteza relativa estimada (%)	15,0																								
Acidez	Incerteza relativa estimada (%)																													
	15,0																													
Resultados	<ul style="list-style-type: none">✓ Os resultados apresentam-se arredondados às centésimas para valores iguais ou inferiores a 4,99 (ml/100 g ou ml/100 ml), para a acidez expressa em NaOH 1N.✓ Os resultados apresentam-se arredondados às centésimas para valores iguais ou inferiores a 4,99 (ml/100 g ou ml/100 ml), para a acidez expressa em NaOH 1N.✓ Para as restantes formas de acidez, os resultados apresentam-se arredondados às centésimas, para toda a gama de trabalho.																													

2. Resultados da Validação do método: Determinação da Fibra Alimentar – PAFQ.230

Os resultados obtidos para cada um dos ensaios realizados estão apresentados no **Anexo 7**.

2.1. Precisão

2.1.1. Repetibilidade

A **repetibilidade** foi avaliada com a realização de 4 ensaios para cada uma das matrizes, em condições de repetibilidade. Com recurso ao impresso da qualidade IQ.22 Estudo da Repetibilidade (**Anexo 3**), avaliou-se os dados obtidos. Foram aplicados os testes de *Grubbs* e *Cochran* e, como seria de esperar, este teste demonstra que as variâncias obtidas no estudo da repetibilidade diferem significativamente entre elas. Isto acontece devido à natureza variada das amostras e aos diferentes teores de fibra, quanto maior o teor maior será a variância observada no conjunto de dados. Assim, foram estabelecidas gamas de trabalho em que os conjuntos de dados inseridos em cada gama apresentam homogeneidade de variâncias, de acordo com o teste de *Cochran*. Nas **Tabelas 20, 21 e 22** estão apresentados os resultados depois de aplicado este teste para as gamas de trabalho definidas: <1, 1-10 e >10. Na **Tabela 23** estão apresentadas as conclusões finais.

Tabela 20 - Média, variância e limite de repetibilidade para os resultados da **Fibra Alimentar com teor <1**.

Matriz	Média	Variância	Limite da Repetibilidade
Molho piri-piri	0,95	0,0045	0,1877
Panaché	0,01	0,0000	0,0140
Bebida de soja	0,27	0,0009	0,0840
Salsicha	0,25	0,0020	0,1242
Arroz Carolino	0,86	0,0051	0,1998

Azeite Virgem Extra	0,08	0,0064	0,2233
Queijo	0,20	0,0027	0,1455
Manteiga (6,8)	0,08	0,0035	0,1649
Ovo líquido (<0,3)	0,26	0,0004	0,0530
Sardinha em conserva (0,8)	0,61	0,0012	0,0956
Conserva de peixe (0,4-4,8)	0,23	0,0020	0,1242

Tabela 21 - Média, variância e limite de repetibilidade para os resultados da **Fibra Alimentar com teor 1-10**.

Matriz	Média	Variância	Limite da Repetibilidade
Paté	1,60	0,0063	0,2222
Farinha Láctea	3,67	0,0191	0,3873
Tremoço em Conserva	8,43	0,0489	0,6190

Tabela 22 – Média, variância e limite de repetibilidade para os resultados da Fibra Alimentar com teor >10.

Matriz	Média	Variância	Limite da Repetibilidade
Café	23,63	1,1574	3,0123
Infusão	52,12	0,6825	2,3132
Leguminosas Secas	26,74	0,4956	1,9712
Mostarda	17,05	0,0238	0,4317
Especiarias	24,99	0,4287	1,8333
Fruta Desidratada	23,63	1,1574	3,0123

Tabela 23 – Limite de repetibilidade da e limite de repetibilidade relativo, associado a cada uma das gamas dos teores de fibra alimentar estabelecidas, para o método interno PAFQ.230 Determinação de Fibra Alimentar.

Teor de Fibra g/100g	Limite Repetibilidade	Limite Repetibilidade Relativo (%)
<1	0,1287	30,76
1-10	0,4095	10,61
>10	1,9123	6,77

2.1.2. Precisão Intermédia

A **precisão intermédia** foi estudada através da análise de duplicados registados. Os resultados foram tratados utilizando o impresso da qualidade IQ.29 Cálculo de precisão intermédia (**Anexo 4**). Na **Tabela 24** são apresentados os desvios padrão e o limite de precisão intermédia obtidos para cada gama de trabalho estudada.

Tabela 24 - Desvio padrão e limite de precisão intermédia obtidos no estudo da precisão intermédia da Determinação de Fibra Alimentar.

Teor de Fibra g/100g	Desvio padrão de precisão intermédia	Limite de precisão intermédia relativo (%)
<10	0,1728382	16,4
>10	0,04164861	0,7

2.2. Exatidão

A exatidão do método foi demonstrada com base nos resultados obtidos nos ensaios de comparação interlaboratorial (ECIs). Nas **Tabela 25 e 26** estão apresentados os resultados obtidos, em cada um dos circuitos participados, juntamente com o valor obtido pelo laboratório (X_{Lab}), o valor aceite como verdadeiro (X_{Ref}), o número de laboratórios participantes (N° Lab) e o desvio padrão robusto (RSD).

Não são apresentados todos os resultados da participação em ECIs, selecionou-se os ensaios de modo que cobrissem a gama de trabalho a validar e, simultaneamente o campo de aplicação, ou seja, matrizes alimentares distintas.

Tabela 25 - Resultados obtidos dos ensaios de comparação interlaboratorial para teores de Fibra <10 g/100g.

Data do circuito ano/mês	ECI	X_{Lab} (g/100 g)	X_{ref} (g/100 g)	N° Lab	RSD	Z-score
01.2012	BIPEA	1,6	1,6	16	0,3	0,00
06.2012	LGC	5,9	6,4	10	0,6	-0,98

06.2012	BIPEA	3,5	3,6	20	0,8	-0,13
09.2012	BIPEA	4,6	5,2	22	0,8	-0,50
10.2012	BIPEA	9,8	12,5	26	1,7	-1,80
12.2012	BIPEA	6,6	7,2	25	1,4	-0,55
01.2013	BIPEA	2,4	2,2	23	0,3	0,50
02.2013	BIPEA	1,0	1,6	23	0,7	-2,00
05.2013	BIPEA	3,5	3,8	28	0,5	-0,50
06.2013	BIPEA	2,1	1,5	24	0,7	1,50
10.2013	BIPEA	0,6	1,3	21	0,8	0,03
05.2013	Silliker	5,6	5,5	12	0,9	-1,75
11.2013	BIPEA	2,0	2,7	19	0,6	-1,75
06.2014	BIPEA	4,0	3,6	24	0,8	0,67
09.2014	BIPEA	2,0	2,4	25	0,6	-1,00
11.2014	BIPEA	1,1	1,4	27	0,3	-1,00
03.2015	BIPEA	0,8	1,0	18	0,6	-0,67
04.2015	BIPEA	4,0	4,1	21	0,7	-0,17
05.2015	BIPEA	7,0	8,5	23	2,1	-1,15
05.2015	Silliker	9,8	8,8	19	2,4	0,42
11.2015	Silliker	4,4	4,2	17	1,0	0,20
03.2016	LGC	0,3	1,00	18	0,39	-1,40
08.2016	Silliker	8,7	8,6	16	1,0	0,11
10.2016	BIPEA	2,4	2,3	38	0,6	0,25
11.2016	BIPEA	2,6	3	27	0,7	-0,80
05.2017	BIPEA	4,6	4,1	29	0,9	0,71
05.2017	BIPEA	4,4	4,1	29	0,9	0,43

Tabela 26 - Resultados obtidos dos ensaios de comparação interlaboratorial para teores de Fibra ≥ 10 g/100g.

Data do circuito ano/mês	ECI	Xlab (g/100 g)	Xref (g/100 g)	Nº Lab	RSD	Z-score
11.2012	Silliker	14,6	14,3	11	0,8	0,39
11.2013	BIPEA	10,3	10,2	19	2,1	0,07
12.2013	Silliker	15,2	14,4	15	1,3	0,58
05.2014	BIPEA	10,2	9,5	22	3,1	0,50
05.2014	Silliker	10,9	10,1	15	1,2	0,67
11.2014	Silliker	10,2	10,1	15	1,0	0,06

A partir da análise das **Tabelas 25 e 26** concluímos que todos os *Z-scores* obtidos são aceitáveis pois estão dentro do intervalo [-2;2].

2.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação é 0,1g/100g para a determinação da Fibra Alimentar.

2.4. Gama de trabalho

Os resultados expressos na **Tabela 27** foram estabelecidos a partir dos teores das amostras analisadas.

Tabela 27 – Gama de trabalho estabelecida a partir da validação efetuada para o método da Determinação da Fibra Alimentar PAFQ.230.

	Limite mínimo	Limite máximo
Teor de Fibra g/100g	0,1g	55g

2.5. Incerteza

A incerteza foi estimada com base na participação em ensaios interlaboratoriais. Estimou-se a incerteza para duas gamas de trabalho: para a gama com o teor de fibra inferior a 10g/100g e para o teor de fibra superior a 10 g/100g, pois como não há circuitos interlaboratoriais com matrizes cujo teor de fibra seja inferior a 1 g/100 g, o laboratório optou por aglomerar com a gama de < 1 e 1-10 g/100 g.

Como referido no capítulo 2, a incerteza com recurso a ECI's é estimada com base em duas componentes: na precisão e na exatidão associadas ao método. A partir do IQ.292 (**Anexo 5**) é possível estimar o valor de incerteza associada para cada uma das gamas de trabalho.

Na **Tabela 28** são apresentados os dados utilizados para a determinação da componente da incerteza associada à precisão intermédia do método, determinado pela **Equação 8**.

Tabela 28 - Dados utilizados para determinar a componente da incerteza associada à precisão do método Determinação da Fibra Alimentar PAFQ.230.

Teor de Fibra <10 g/100g		Teor de Fibra ≥ 10 g/100g	
Desvio padrão da precisão intermédia	0,1728	Desvio padrão da precisão intermédia	0,0416
\bar{x}	2,948	\bar{x}	17,8286
n	816	n	50
$R_{W,relative}$	5,863	$R_{W,relative}$	0,234

Os dados utilizados para a determinação da incerteza associada à exatidão foram apresentados nas **Tabelas 24 e 25**. A partir dos mesmos foi calculado o valor da incerteza estimada para o método, apresentada na **Tabela 29**

Tabela 29 – Incerteza Relativa estimada para a validação do método da Determinação de Fibra Alimentar

Teor de Fibra Alimentar g/100g	Incerteza relativa estimada (%)
<10	24,6
≥ 10	15,1

2.6. Resultados

Os resultados apresentam-se arredondados às centésimas para toda a gama de trabalho deste método.

Na **Tabela 30** estão apresentados todos os resultados obtidos para a Validação do método Determinação da Fibra Alimentar PAFQ.230.

Tabela 29 - Apresentação dos resultados finais para a Validação da Determinação de Fibra Alimentar PAFQ.230.

Critérios	Resultados obtidos			
Repetibilidade	Fibra	g/100g	Limite de repetibilidade relativo (%)	
			Valor calculado	Valor majorado/ minorado
		<1,0	30,76	31,00
		1-10	10,61	11,00
		>10	6,77	7,00
Precisão intermédia	Fibra Alimentar	g/100 g		Limite de precisão intermédia relativo (%)
		<10		16,40
		≥ 10		0,65
Exatidão	✓ Com base nos ensaios realizados e nos resultados obtidos, demonstra-se que os valores de exatidão obtidos cumprem com os critérios estabelecidos para as matrizes analisadas.			

Limite de quantificação	✓ O limite de quantificação é de 0,1g/100g ml para a fibra alimentar.		
Gama de trabalho			
	Teor de Fibra	Limite mínimo	Limite máximo
	g/100g	0,1	55
Incerteza	Teor de Fibra g/100g	Incerteza relativa estimada (%)	
	<10	24,59	
	≥ 10	15,07	
Resultados	✓ Os resultados apresentam-se arredondados às centésimas para toda a gama de trabalho.		

3. Conclusão

A segurança alimentar é constituída por um conjunto de normas que visam assegurar a adequabilidade dos alimentos e/ou matérias-primas desde a sua produção, transporte e armazenamento até ao seu consumo. Dada a sua importância, estas regras tornaram-se internacionais para que os alimentos possam satisfazer as necessidades comerciais e sanitárias, numa perspetiva de sustentabilidade.

Por estas razões o controlo da qualidade tornou-se numa necessidade permanente e contínua, garantindo que o consumidor ficará bem informado acerca do produto que tenciona adquirir.

A Silliker Portugal S.A. procura ajudar empresas no ramo alimentar a garantirem a qualidade dos seus produtos. Desta forma, este estágio contribui para aumentar e melhorar as minhas competências no controlo de qualidade. Tive oportunidade de trabalhar a partir de um Sistema de Gestão da Qualidade, o que me permitiu entender os requisitos associados à qualidade de um resultado analítico. Verifiquei que o laboratório da Silliker Portugal aplica os requisitos da NP EN ISO/IEC 17025 em todos os métodos implementados, incluindo os que não são acreditados, conseguindo controlar e garantir a qualidade de todos os resultados produzidos, a fim de transmitir confiança ao cliente nos serviços prestados.

O objetivo da validação do Método da Determinação de Acidez PAFQ.197 foi cumprido e através dos resultados obtidos, podemos concluir que este método é capaz de analisar todos os géneros alimentícios.

No caso do método da Determinação da Fibra Alimentar PAFQ.230, a validação ficou por concluir. É de relembrar que este método inclui muitas etapas, podendo demorar cerca de 4/5 dias para cada uma das amostras. Por esta razão, a incerteza associada tende a ser mais elevada. Mesmo assim, os resultados obtidos mostram que o método é eficiente e que cumpre os requisitos obrigatórios.

A partir do trabalho laboratorial desenvolvido constatei que o processo de validação não é linear, variando de método par método, das ferramentas de validação disponíveis e dos recursos existentes. Por estas razões, é importante que o plano de validação seja planeado e estabelecido antecipadamente.

4. Bibliografia

- [1] Mérieux NutriSciences (site: <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/>, consultado em **2017**, Julho 20).
- [2] Silliker Portugal S.A., “Manual da Qualidade”, Ed. 12, **2015**.
- [3] Mérieux NutriSciences (site: <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/silliker/sobre-a-silliker/silliker-Portugal>, consultado em **2017**, Julho 20).
- [4] Bouhlal S., Issanchou S., Nicklaus S.; “The impact of salt, fat and sugar levels on toddler food intake.” Br J Nutr 105:645-653, **2011**.
- [5] Kendall C.W.C., Esfahani A., Jenkins D.J.A.; “The link between dietary fibre and human health” Food Hydrocolloids, 24, 42-48., **2010**.
- [6] Sousa, L.M.; “Incorporação e optimização de aditivos alimentares e auxiliares Tecnológicos em produtos de panificação” Universidade Católica Portuguesa, **2012**.
- [7] NP- 1421:1977 “Géneros alimentícios derivados de frutos e de produtos hortícolas. Determinação de Acidez”, **1977**.
- [8] Santos, J.R.; “Determinação do teor de fibra alimentar em produtos hortofrutícolas” Universidade de Lisboa, **2013**.
- [9] PAFQ.230 “Determinação de Fibra Alimentar” Silliker Portugal S.A., **2015**.
- [10] Elleuch M., Bedigian D., Roiseux O., Besbes S., Blecker C., Attia H.; “Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: characterisation, technological functionality and commercial applications: a review”. Food Chemistry, 124, 411-421., **2011**.
- [11] Relacre Guia Relacre 13, “Validação de métodos internos de ensaio em análise química.” Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, pp 1-30, **2000**.
- [12] EURACHEM, Eurachem Guide: “The fitness for purpose of Analytical Methods”, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, **2014**.
- [13] Relacre Guia Relacre 13, “Validação de métodos internos de ensaio em análise química.”, **2002**.

- [14] ISO 5725-3:2013 “ Accuracy (truness and precision of measurement methods and results. Part 3: Intermediate meadures of the precision of a standart measurement method.”, **2013**.
- [15] Valentini SR, Sommer WA, Matioli G. Validação de métodos analíticos.;11(2):26-31, **2007**.
- [16] Guia Relacre 9, Alguns Exemplos de Cartas de Controlo em Laboratórios de Análise Química, Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (RELACRE), Edição de Novembro **1998**.
- [17] Silliker Portugal S.A., PCQ.04 “Procedimentos de Controlo de qualidade”, **2013**.
- [18] ISO/IEC Guide 43-1:1997, “Proficiency testing by interlaboratory comparison — Part 1:Development and operation of proficiency testing schemes”, **1997**.
- [19] NP EN ISO/IEC 17025:2005 “Requisitos Gerais sobre competência para laboratórios de ensaio e calibração”, **2005**.
- [20] Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, RELACRE (site: <http://www.relacre.pt/>, consultado em **2017**, Agosto).
- [21] BIPM, JCGM 100 “Evaluation of measurement data”, Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), **2008**.
- [22] EUROLAB, Technical Report No.1/2002, “Measurement Uncertainty in Testing. A short introduction on how to characterise accuracy and reliability of results including a lis of useful references”, **2002**.
- [23] NORDTEST Technical Report 537, “Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories”, **2004**.
- [24] Silliker Portugal S.A.; IQ 292 “Estimativa da incerteza”, **2016**
- [25] Harris, D. C. “Quantitative Chemical Analysis” 7ª Ed. W.H. Freeman and Company, New York, **2007**.
- [26] Silliker Portugal, S.A. PAFQ .”Métodos de preparação das amostras para análise”, **2014**.
- [27] Skoog, D.A., West, D.M., e Holler, F.J., “Fundamentos de química analítica” 8ª Ed., Thomson, **2006**

CAPÍTULO V

Anexos

Anexo 1 - Teste de Grubbs

O valor de *Grubbs* ($G_{calculado}$) é calculado segundo a **Equação 12** e quando comparado com o valor crítico de *Grubbs* tabelado para n graus de liberdade para um nível de confiança de 99%, têm-se duas hipóteses:

- se $G_{calculado} < G_{tabelado}$ o valor suspeito não é aberrante face ao conjunto de dados considerados;
- se $G_{calculado} > G_{tabelado}$ o valor suspeito é aberrante face ao conjunto de dados considerados, como tal deve ser rejeitado.

$$G_{calculado} = \frac{|x_s - \bar{x}|}{s}$$

Equação 12

em que x_s é o valor considerado suspeito, \bar{x} e s é o valor médio e o desvio padrão, respetivamente, do conjunto de dados considerado.

Anexo 2 - Teste de Cochran

O valor de *Cochran* ($C_{calculado}$) é calculado segundo a **Equação 13** e comparado com o valor crítico tabelado ($C_{tabelado}$) para um nível de confiança de 95% para $n - 1$ graus de liberdade, em que n é o número de conjunto de dados considerados.

$$C_{calculado} = \frac{S_{ri}^2 máx}{\sum S_{ri}^2}$$

Equação 13

em que, $S_{ri}^2 máx$ é a variância máxima observada no conjunto de dados considerados e $\sum S_{ri}^2$ o somatório de todas as variâncias consideradas.

As hipóteses consideradas neste teste estatístico são:

- se $C_{calculado} < C_{tabelado}$ os conjuntos de dados considerados apresentam variâncias que não são significativamente diferentes;
- se $C_{calculado} > C_{tabelado}$ os conjuntos de dados considerados apresentam variâncias que são significativamente diferentes.

Anexo 3 – Impresso IQ.22 Estudo da Repetibilidade

Grupo	Matriz	TESTE DA REPETIBILIDADE														TESTE DE GRUBBS									
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Média	Variança	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite de repetibilidade	População	Valor crítico 1%	Valor mínimo	6º Valor mínimo	Torto ou valor mínimo	Valor máximo	6º Valor máximo	Torto ou valor máximo	
Torta C de Cochran	Número de matrizes:	Menor variância:				Valor crítico tabelado - C_c (5%):					Avaliação:		Conclusão:												
		C de Cochran (calculada):																							
		Valor do limite de repetibilidade (média dos resultados da coluna "Limite de repetibilidade")																							
Matrizes eliminadas (após execução do teste de Cochran)																									
Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10														

Nota 1: Grau de liberdade = $n-1$, em que n é o número de ensaios (10).

Nota 2: Se não couberem, no mínimo, duas matrizes para se executar a torta de Cochran.

- se $C < C_c$ (no nível de significância de 5%) aceita-se a hipótese nula

- se $C_c (1\%) > C > C_c (5\%)$ situação suspeita

- se $C > C_c (1\%)$ rejeita-se a hipótese nula

Anexo 4 – Impresso IQ.29 Estudo da Precisão Intermédia

Cálculo da precisão intermédia (ensaio com duplicados)									
Ano (s):				Elemento/composto:					
Método:									
				$Si = \sqrt{\frac{1}{2t} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2}$					
				População :					
				Desvio padrão da precisão intermédia (Si):					
				Limite de precisão intermédia:					
Data	N.º Amostra	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	Wi	Wi²	X	A-X	B-X

O desvio padrão de precisão intermédia (s_i) quando avaliada por duplicados é dado segundo a **Equação 14**

$$Si = \sqrt{\frac{1}{2t} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2}$$

Equação 14

em que, t é o número de duplicados considerados, $\sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2$ é o somatório do quadrado das diferenças entre cada um dos duplicados, n o número de dados considerados, e $\sum (y_{j1} - y_{j2})^2$ o somatório do quadrado da diferença entre cada valor obtido, e a média de dados considerados.

Previamente à determinação do desvio padrão de ensaio único deve-se aplicar o teste de *Grubbs* ao conjunto de dados considerado, a fim de averiguar a presença de valores aberrantes.

Anexo 5 – Impresso IQ.292 Estudo da Estimativa da Incerteza

Date:		Person responsible:	
Analite:		Method:	

Legend			
1 - Within-laboratory reproducibility standard uncertainty (intermediate precision)			
$x_i = \text{One result}$ $n = \text{number of results}$ $\bar{x} = \text{Mean value}$ $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$ $u(x) = \text{Individual standard uncertainty component}$ $u(R_W) = \text{Within - laboratory reproducibility (intermediate precision) standard uncertainty}$ $R_W = s = \text{Population standard deviation} = u(R_W)$ $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$ $R_{W,relative} = \%rsd = \text{Population relative standard deviation (in \%)}$ $R_{W,relative} = \%rsd = \frac{R_W \times 100}{\bar{x}}$ If we have different origins of $R_{W,relative}$, we can combine them: $R_{W,relative,c} = \text{Populations relative standard deviations (in \%), combined}$ $u(R_{W,relative,c}) = R_{W,relative,c} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (u(R_{W,relative,i}))^2}{n_{R_W}}}$			
Reference			
R_W			
\bar{x}			
Units			
n			
$R_{W,relative}$			
$u(R_{W,relative,c}) = R_{W,relative,c} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (u(R_{W,relative,i}))^2}{n_{R_W}}}$			
2 - Standard uncertainty component for bias			
$u(bias)_{relative} = \text{Uncertainty component for bias (in \%)}$ $u(bias)_{relative} = \sqrt{RMS_{bias,relative}^2 + u(C_{Ref})_{relative}^2}$ $RMS_{bias,relative} = \text{Root Mean Square (related to all bias and in relative value) or the Quadratic Mean, is the square root of the arithmetic mean of the squares of a set of numbers}$ $RMS_{bias,relative} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (bias_{relative,i})^2}{n_{PT}}}$ $n_{PT} = \text{number of PT results used}$ $bias_{relative} = \frac{(LV - AV)}{AV} \times 100$ $LV = \text{Laboratory Value}$ $AV = \text{Assigned value, from the PT report}$ $s_R = \text{Robust standard deviation of the laboratories result, from the PT report}$ $s_{R,relative} = \frac{s_R \times 100}{AV}$ $s_{R,relative} = \text{Robust standard deviation of the laboratories result (in \%)}$ $\bar{s}_{R,relative} = \frac{\sum_{i=1}^n s_{R,relative,i}}{n_{PT}}$ $\bar{s}_{R,relative} = \text{Mean of robust standard deviation of the laboratories results (in \%)}$ $P = \text{Population, from the PT report}$ $\text{Population} = \text{Number of valid results submitted into the PT and used for robust mean and standard deviation calculation}$ $\bar{P} = \frac{\sum_{i=1}^n P_i}{n_{PT}}$ $\bar{P} = \text{Mean of populations}$ $u(C_{Ref})_{relative} = 1,253 \times \frac{\bar{s}_{R,relative}}{\sqrt{\bar{P}}}$ $u(C_{Ref})_{relative} = \text{Uncertainty component from the certified value (in \%)}$			

Anexo 6 – Resultados Determinação de Acidez PAFQ.197

Tabela 30 – Resultados da Validação Determinação da Acidez PAFQ.197.

Grupo	Matriz	TESTE DA REPETIBILIDADE							
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Caramelos	0,8243	0,7362	0,8284	0,7781	0,7550	0,8000	0,7603	0,7395
	Rebuçados	12,6687	12,8537	12,7374	12,8826	12,7364	12,7862	12,9166	12,6540
Alimentos confeccionados	Pizza	7,8767	7,9900	7,7614	8,2235	8,2472	7,7380	8,3526	8,1489
Bebidas não alcoólicas	Água tônica	6,3786	6,3694	6,4530	6,4211	6,5589	6,4678	6,5150	6,4757
	Bebida energética	9,5546	9,6930	9,5261	9,7305	9,6051	9,7233	9,6233	9,6853
	BIPEA - Diet soda	2,4485	2,4426	2,3907	2,4542	2,3905	2,3820	2,4668	2,4419
Carnes, produtos cárneos e derivados	Sangue	0,3210	0,3604	0,3608	0,3218	0,3213	0,3201	0,3184	0,3215
Cereais, leguminosas pseudo-cereais e derivados	Pão de forma	3,8525	3,9669	3,8134	3,6305	3,8423	4,1053	3,7264	3,6884
	Pão de leite	4,4631	4,4220	4,5316	4,3840	4,3386	4,4606	4,4166	4,4591
	Pastelaria	1,1532	1,1432	1,1124	1,1195	1,1051	1,2279	1,1834	1,2006

Anexo 7 – Resultados Determinação de Fibra Alimentar PAFQ.230

Tabela 31 – Resultados da Validação Determinação de Fibra Alimentar PAFQ.230.

Grupo	Matriz	TESTE DA REPETIBILIDADE			
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Preparado de Pudim	0,54	0,99	0,83	0,84
	Marmelada	-	-	-	-
	Chocolate Preto	-	-	-	-
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Paté	1,56	1,50	1,65	1,67
	Molho piri-piri	0,86	0,96	1,02	0,97
	Produto acabado	-	-	-	-
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Farinha Láctea	3,62	3,81	3,50	3,75
	Levedura de cerveja	-	-	-	-
	Suplemento alimentar	4,23	4,08	3,12	3,32
Bebidas Alcoólicas	Cerveja sem álcool	-	-	-	-
	Vinho Tinto	-	-	-	-
	Panaché	0,01	0,01	0,00	0,01
Bebidas não Alcoólicas	Bebida de soja	0,25	0,29	0,23	0,29
	Sumo	-	-	-	-
	Batido	-	-	-	-
Café, chá, infusões e derivados.	Café	24,73	24,36	22,80	22,61
	Infusões	51,71	53,04	51,19	52,53
	Café torrado grão	-	-	-	-
Carnes, produtos cárneos e derivados	Alheira	-	-	-	-
	Salsicha	0,23	0,27	0,29	0,19
	Caldo	-	-	-	-

Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Arroz Carolino	0,84	0,94	0,88	0,77
	Leguminosas Secas	27,24	26,06	27,45	26,22
	Farelo	-	-	-	-
Especiarias, condimentos e derivados	Vinagre	-	-	-	-
	Mostarda	16,99	17,00	17,27	16,92
	Especiarias	24,01	25,29	25,40	25,25
Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados	Rebentos	-	-	-	-
	Tremoço em conserva	8,44	8,21	8,73	8,34
	Fruta desidratada	13,05	12,79	12,58	12,40
Gorduras, óleos, sementes oleaginosas e derivados	Azeite virgem extra	0,01	0,02	0,13	0,17
	Maionese	-	-	-	-
	Sementes oleaginosas	-	-	-	-
Leite, produtos lácteos e derivados	Leite com chocolate	-	-	-	-
	Queijo	0,13	0,25	0,22	0,18
	Manteiga	0,14	0,02	0,12	0,04
Ovos e derivados	Ovo líquido	0,25	0,29	0,25	0,26
Produtos da pesca e derivados	Sardinha em conserva	0,60	0,56	0,64	0,62
	Conserva de peixe	0,18	0,20	0,24	0,28

